

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität München

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Regulation der Immunantwort:
CCL22 und CCL17 vermitteln die Interaktion zwischen
dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen**



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maximilian W. M. Wintergerst

aus Trostberg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. David Anz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner
Prof. Dr. rer. nat. Dolores Schendel
Priv. Doz. Dr. rer. nat. Reinhard Obst

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2017

*Ludmila
und meinen Eltern
Eva und Wilhelm*

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Maximilian Wintergerst, an Eides statt,
dass die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Regulation der Immunantwort: CCL22 und CCL17 vermitteln die Interaktion
zwischen dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen**

selbstständig verfasst, mich außer den angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel
bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd
übernommen sind, als solche kenntlich und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, 01.06.2017

Maximilian Wintergerst

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das angeborene und das adaptive Immunsystem	1
1.2	Dendritische Zellen	2
1.2.1	Entstehung und Einteilung	2
1.2.2	Aktivierung von dendritischen Zellen	3
1.2.3	Die Torwächter des Immunsystems	5
1.2.4	Vakzinierung mit dendritischen Zellen	6
1.3	Regulatorische T-Zellen.....	6
1.3.1	Entstehung und Einteilung	7
1.3.2	Mechanismen der Suppression	8
1.4	Chemokine	10
1.4.1	Die Funktion von Chemokinen	11
1.4.2	Die Chemokine CCL22 und CCL17	11
2	Zielsetzung	13
3	Material.....	14
3.1	Geräte	14
3.2	Chemikalien und Lösungen	15
3.3	Reagentsätze / Kits.....	15
3.4	Materialien für die Zellkultur.....	16
3.5	Zytokine, Wachstumsfaktoren, Peptide und Stimulantien.....	17
3.6	<i>short-interfering RNAs</i> (siRNAs)	18
3.7	Antikörper	18
3.8	Enzyme	18
3.9	Primer.....	19
3.10	DC2.4 Zelllinie	19
3.11	Versuchstiere.....	19
3.12	Software	20
4	Methoden.....	21
4.1	Zellkultur	21
4.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen	21
4.1.2	Zellzahlbestimmung.....	21
4.1.3	Zellisolation und -aufreinigung	21
4.1.3.1	Isolation muriner Splenozyten	21
4.1.3.2	Isolation murinen Knochenmarks	22

4.1.3.3	Isolation humaner peripherer Blutlymphozyten und Monozyten.....	22
4.1.3.4	Zellaufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung.....	23
4.1.4	Zellgenerierung.....	23
4.1.4.1	<i>In vitro</i> Generierung muriner <i>bone-marrow-derived-dendritic-cells</i> (BMDCs)	23
4.1.4.2	<i>In vitro</i> Generierung humaner blood-monocyte-derived-dendritic-cells (hBMDCs)	24
4.1.5	Zellfärbungen.....	24
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	24
4.2.1	Extraktion zytoplasmatischer RNA.....	24
4.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
4.2.3	Reverse Transkription.....	25
4.2.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	26
4.2.5	Gelelektrophorese	27
4.2.6	DNA Extraktion aus einem Agarosegel	28
4.2.7	Sequenzeinbau in ein Plasmid.....	28
4.2.8	Klonierung eines Plasmides.....	29
4.2.9	Plasmidpräparation.....	29
4.2.10	Virusgenerierung und Transfektion	29
4.2.11	Knockdown mittels RNA-Interferenz	31
4.3	Enzyme-linked immunosorbent assay.....	31
4.4	Durchflusszytometrie	32
4.4.1	allgemeines Funktionsprinzip.....	32
4.4.2	Bestimmung von Oberflächenmolekülen	32
4.4.3	Bestimmung von intrazellulären Molekülen	33
4.5	Vakzinierung von Mäusen mit dendritischen Zellen	33
4.5.1	Stimulation und Beladung von dendritischen Zellen mit OVA ₂₅₇₋₂₆₄	33
4.5.2	Vakzinierung der Mäuse	33
4.6	Interferon- γ Restimulationsassay.....	33
4.7	<i>In vitro</i> Kontaktanalyse	34
4.7.1	Etablierung des dreidimensionalen Kontakt- und Migrationsassays.....	34
4.7.2	Versuchsaufbau.....	37
4.7.3	Auswertung	39
4.8	Statistische Analyse.....	41
5	Ergebnisse.....	42
5.1	CCL22 Produktion dendritischer Zellen führt selektiv zu mehr Kontakten mit regulatorischen T-Zellen.....	42

5.1.1	DC-T _{reg} -Zell-Kontakte sind unter CCL22 Überexpression durch DCs vermehrt.....	42
5.1.2	DC-T _{reg} -Zell-Kontakte sind unter selektivem CCL22 Knockout in DCs verringert	44
5.1.3	DC-T _{reg} -Zell-Kontakte sind unter CCL22 Knockdown in DCs verringert .	46
5.2	CCL17 Produktion dendritischer Zellen führt selektiv zu mehr Kontakten mit regulatorischen T-Zellen.....	47
5.2.1	DC-T _{reg} -Zell-Kontakte sind unter CCL17 Überexpression durch DCs vermehrt.....	48
5.2.2	DC-T _{reg} -Zell-Kontakte sind unter CCL17 Knockdown in DCs verringert .	49
5.3	CCL22-vermittelte Kontaktformation ist CCR4-abhängig	51
5.4	<i>In vivo</i> induzieren CCL22-defiziente dendritische Zellen eine verstärkte Immunantwort	52
5.5	CCL22 und CCL17 Produktion dendritischer Zellen führt auch im humanen System selektiv zu mehr Kontakten mit regulatorischen T-Zellen	53
5.5.1	DC-T _{reg} -Zell-Kontakte sind unter CCL22 Knockdown in DCs verringert .	54
5.5.2	DC-T _{reg} -Zell-Kontakte sind unter CCL17 Knockdown in DCs verringert .	55
6	Diskussion	57
6.1	Kontaktformation regulatorischer T-Zellen mit dendritischen Zellen wird über CCL22 und CCL17 vermittelt.....	57
6.2	Kontaktformation regulatorischer T-Zellen mit dendritischen Zellen über CCL22 und CCL17 ist selektiv für regulatorische T-Zellen.....	60
6.3	Funktionelle Bedeutung der Kontaktformation regulatorischer T-Zellen mit dendritischen Zellen	62
6.4	Diskussion widersprüchlicher Literatur zu CCL17	64
6.5	Übertragbarkeit auf den Menschen und klinisch-therapeutische Ansatzpunkte	66
7	Zusammenfassung	69
8	Literaturverzeichnis.....	71
9	Abkürzungsverzeichnis	87
10	Danksagung.....	89
11	Veröffentlichungen	90
12	Lebenslauf	93

1 Einleitung

1.1 Das angeborene und das adaptive Immunsystem

Unser Körper ist einer konstanten Bedrohung durch Pathogene, wie Bakterien und Viren, aber auch durch neoplastische Zellen ausgesetzt. Um diesen Bedrohungen entgegen zu wirken hat sich im Laufe der Evolution das Immunsystem entwickelt (Pancer and Cooper 2006, Litman et al. 2010). Dieses besteht aus zwei Teilen: dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem (Marrack and Kappler 1994). Ersteres beinhaltet die Barriere durch Epithelzellen, das Komplementsystem und Phagozyten wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophile. Das angeborene Immunsystem erkennt Pathogene anhand typischer struktureller und funktioneller Eigenschaften und dies mit stets den gleichen Erkennungs-Mechanismen. Allerdings machen zu sehr schneller Veränderung fähige Erreger, wie beispielsweise Viren, eine Anpassungsfähigkeit des Immunsystems notwendig. Aus diesem Grund entwickelte sich das adaptive Immunsystem. Dieses lässt sich in die Population der T- und der B-Zellen unterteilen. Während zytotoxische T-Zellen der Zell-vermittelten Abwehr dienen, machen B-Zellen den humoralen Teil einer Immunantwort aus. T-Helfer (T_h)-Zellen kontrollieren zusammen mit Antigen-präsentierenden-Zellen die Entstehung einer Immunantwort und bestimmen, ob sich eine Typ 1 (zelluläre) oder eine Typ 2 (humorale) Immunreaktion entwickelt.

Diese Einteilung ist nicht immer eindeutig, wie am Beispiel der Natürlichen Killer Zellen zu sehen, welche sowohl Merkmale des angeborenen, wie auch des adaptiven Immunsystems aufweisen (Biron 2010, Vivier et al. 2011). Auch findet eine gegenseitige Beeinflussung beider Arme des Immunsystems statt. Am eindrucklichsten ist dies an der Antigenpräsentation durch die Antigen-präsentierenden-Zellen des angeborenen Immunsystems zu sehen, welche den Anfang jeder Immunantwort des adaptiven Immunsystems ausmacht (Janeway 1989, Hoebe et al. 2004, Iwasaki and Medzhitov 2015).

Auf Grund ihrer Schlüsselfunktion bei der Generierung und Steuerung der Immunreaktion stellen die dendritischen Zellen eine der bedeutendsten Schnittstellen zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar.

1.2 Dendritische Zellen

Die dendritische Zelle (DC) wurde 1973 von Steinman und Cohn entdeckt (Steinman and Cohn 1973) und als Zellen mit multiplen Zellausläufern beschrieben. Wenige Jahre später wurde herausgefunden, dass sie Antigene binden können (Van Rooijen 1978) und eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Immunantwort spielen (Steinman and Witmer 1978, Boog et al. 1985, Inaba and Steinman 1985). Im Jahre 2011 wurde Ralph M. Steinman posthum für die Entdeckung der dendritischen Zelle der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen (Nobelassembly 2011).

1.2.1 Entstehung und Einteilung

DCs entstehen aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und benötigen für ihre Differenzierung *in vivo* Flt3L (Maraskovsky et al. 1997, Naik et al. 2007, Onai et al. 2007). Ebenfalls eine wichtige Rolle spielen Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) (Pixley and Stanley 2004), Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) (Sallusto and Lanzavecchia 1994), Lymphotoxin β (Wu et al. 1999) und *Transforming growth factor* (TGF)- β (Borkowski et al. 1996). Mittlerweile hat man viele verschiedene Subklassen von DCs gefunden, deren Einteilung noch Gegenstand aktueller Diskussion ist (Heath and Carbone 2009, Reizis et al. 2011, Satpathy et al. 2012, Steinman 2012, Heath and Carbone 2013).

Vereinfachend lassen sich DCs im Immunsystem der Maus in verschiedene Subkategorien einteilen, diese sind zusammen mit ihrer jeweiligen Funktion in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: verschiedene Subklassen von dendritischen Zellen in der Maus

Bezeichnung	Funktion
Plasmazytoide DC (pDC)	Förderung der angeborenen Immunität durch Interferon (IFN) - α Sekretion
CD8+ DC / CD103+ DC (im Lymphorgan) / (in der Peripherie)	Förderung der zellulären Immunantwort (CD8+ T-Zellen); Kreuzpräsentation
CD4+ DC / CD11b+ DC (im Lymphorgan) / (in der Peripherie)	Förderung der humoralen Immunantwort (CD4+ T-Zellen)
Langerhans-Zelle	Regulatorische Funktionen

Modifiziert nach (Heath and Carbone 2013)

Beim Menschen lässt sich eine Charakterisierung der verschiedenen DC Subklassen unter anderem anhand der *blood-dendritic-cell-antigens* (BDCAs) vornehmen (Dzionek et al. 2000). Den CD (*Cluster of differentiation*) 8+ DCs in der Maus entsprechen BDCA3+ DCs und den CD11b+ DCs der Maus entsprechen BDCA1+ DCs (Satpathy et al. 2012).

Die pDCs haben eine sphärische Gestalt und ähneln den Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Sie sind nicht-phagozytisch und entsprechend uneffektiv bei der Antigen-Präsentation (Reizis et al. 2011). Sie dienen der schnellen Erkennung einer viralen Infektion unter anderem über Toll-*like*-Rezeptor 7, worauf hin sie große Mengen von IFN- α produzieren (Hornung et al. 2005). Alle übrigen DC-Subklassen lassen sich als "klassische" (früher: myeloide) DCs zusammenfassen. Sie haben eine dendritische Morphologie, eine kürzere Lebensdauer von drei Tagen bis zwei Wochen, phagozytieren und prozessieren, um Antigene in peripherem Gewebe aufzugreifen und migrieren zu den sekundären Lymphorganen. Dort präsentieren sie die Antigene in den T-Zell-Zonen und können eine Immunantwort hervorrufen (Randolph et al. 2005, Ginhoux et al. 2009).

1.2.2 Aktivierung von dendritischen Zellen

Neu geschaffene, unreife klassische DCs haben noch eine hohe endozytotische Aktivität und geringe *Major-Histocompatibility-Complex* (MHC)-I und -II Expression. Dies ändert sich nach Kontakt mit *Pathogen-associated-molecular-patterns* (PAMPs), *Danger-associated-molecular-patterns* (DAMPs) oder inflammatorischen Zytokinen: die Phagozytose und Protein-Prozessierung wird für wenige Stunden gesteigert und darauf folgend herunter reguliert sowie die MHC-Dichte auf der Zelloberfläche verstärkt, um die aufgefangenen Antigene zu präsentieren (Pierre et al. 1997, Mellman and Steinman 2001, Trombetta et al. 2003). Dieser Prozess wird Aktivierung, beziehungsweise Reifung (engl. *maturation*) genannt. Die Expression von MHC-Molekülen auf DCs wurde 1979 und der Prozess der Aktivierung 1985 das erste Mal beschrieben (Rouse et al. 1979, Schuler and Steinman 1985).

DCs können durch verschiedene Stoffe und Signale aktiviert, also zu reifen DCs werden. Bei der Erkennung dieser spielen *Pattern-recognition-receptors* (PRRs) eine entscheidende Rolle.

Eine der bekanntesten PRRs sind die Toll-*like*-Rezeptoren (TLR). Jeder der 12 TLRs in Mäusen, beziehungsweise 10 in Menschen erkennt eine einzigartige Gruppe von Liganden. So erkennt der an der Zelloberfläche exprimierte TLR 4 beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) von bakteriellen Zellwänden und der im Endolysosom befindliche TLR 9 bakterielle Cytosin- und Guanin-reiche Oligonukleotid (CpG ODN) DNA (Lee et al. 2012). Für CpG ODN konnte gezeigt werden, dass sie eine starke Aktivierung von murinen (Sparwasser et al. 1998) und humane DCs (Hartmann et al. 1999) hervorrufen. Eine weitere Gruppe von PRRs der DCs bilden die C-Typ Lektin-Rezeptoren. Sie können bakterielle, virale und von Pilzen abstammende Zuckerverbindungen Calcium-abhängig erkennen (Sancho and Reis e Sousa 2012). Die intrazellulären liegenden *Nucleotide-binding oligomerization domain* ähnlichen Rezeptoren (NOD-*like*-Rezeptoren) binden unter Anderem bakterielle Peptidoglykane und spielen ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung von DCs (Franchi et al. 2012). Die gleichermaßen intrazellulär liegenden *Retinoic-acid-inducible-gene 1* (RIG-I)-ähnlichen Rezeptoren erkennen virale Ribonukleinsäuren und führen, wie auch die NOD-*like*-Rezeptoren zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalweges oder des Inflammasoms (Hammer and Ma 2013). Die hier besprochenen PRRs sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und sind oft spezifisch auf einer Subklasse von DCs exprimiert (Steinman 2012).

Neben den PRRs können auch endogene Botenstoffe wie Interleukin (IL)-1 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α zu einer Aktivierung von DCs führen (Fujii et al. 2004, Pang et al. 2013). Auch Zellen wie T-, natürliche Killer-Zellen, natürliche Killer-T-Zellen und γ - δ -T-Zellen (Fujii et al. 2003, Munz et al. 2005) und Produkte sterbender Zellen (Gallucci et al. 1999) können aktivierend wirken.

Wenn es durch einen dieser mannigfaltigen Stimuli zur Aktivierung einer DC kommt, werden Aktivierungsmarker wie MHC-I und -II Moleküle und die Costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf ihrer Zelloberfläche hochreguliert (Young et al. 1992, Cresswell 1994, Larsen et al. 1994, Turley et al. 2000). CD80 und CD86 sind für die Immunogenität der DC von maßgeblicher Bedeutung. Des Weiteren werden CD40, CD274 und CD273 vermehrt exprimiert (Steinman 2012). Der nun von einer DC erreichte Zustand wird als phänotypische Aktivierung bezeichnet. Sie ist noch nicht notwendiger Weise auch funktionell aktiviert, also immunstimulatorisch, ja sie kann sogar Toleranz gegenüber einem Antigen erzeugen (Menges et al. 2002, Sporri and Reis e Sousa 2005). Von funktioneller Aktivierung spricht man, wenn sich die DC den minimalen oder kompletten zellulären Veränderungen unterzogen hat, die sie befähigen eine

Immunstimulation auszulösen (Reis e Sousa 2006). Es ist noch nicht genau verstanden, wie der Prozess der funktionellen Aktivierung abläuft (Steinman 2012).

1.2.3 Die Torwächter des Immunsystems

An der DC entscheidet sich maßgeblich, ob eine Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen entsteht und wenn ja, welche. Hierbei spielt der Aktivitätszustand der DC eine ganz entscheidende Rolle. Unreife, also noch nicht aktivierte DCs können in peripheren CD4+ und CD8+ T-Zellen eine Toleranzreaktion durch Einleitung von Deletion, Anergie oder Regulationsmechanismen auslösen (Steinman and Nussenzweig 2002, Steinman et al. 2003). Reife DCs sind dagegen in der Lage eine Immunreaktion auszulösen (Banchereau et al. 2000).

Um eine T-Zelle auf einen bestimmten Antigen-Reiz hin zu aktivieren sind vereinfacht dargestellt drei äußere Signale notwendig (Schwartz and Mueller 2003). Das erste Signal ist die Erkennung eines zum T-Zell-Rezeptor passenden Antigens auf einem MHC-I oder -II Molekül. Erfährt eine T-Zelle dieses Signal, so führt dies zur Toleranzinduktion gegenüber dem Antigen. Das zweite Signal ist die Stimulation einer T-Zelle durch die Costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Hierzu binden CD80 und CD86 an CD28 der T-Zelle (Keir and Sharpe 2005). Zusammen mit dem ersten Signal führt dies zur Einleitung einer Immunantwort, die T-Zelle durchläuft eine klonale Expansion und es bilden sich Gedächtnis-T-Zellen aus (Kearney et al. 1994). Das dritte Signal machen Zytokine der Antigen-präsentierenden-Zelle aus, die die Richtung der Immunantwort und damit die weitere genaue Differenzierung der T-Zelle bestimmen (Curtsinger et al. 1999). Die Entstehung einer Typ-1 T_H -Zelle und damit einer Typ 1 Immunantwort wird durch IL12, IL18 oder IFN- α eingeleitet (Kapsenberg 2003). Welche Signale zur Entstehung einer Typ-2 T_H -Zelle und damit Typ 2 Immunantwort führen ist noch Gegenstand aktueller Diskussion (Pulendran et al. 2010, Bell et al. 2013, Bordon 2013). In Zusammenschau der Funktion der DC wird klar, welche wichtige Bedeutung die Costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 haben, da es ohne sie nicht zur Auslösung einer Immunantwort kommen kann.

1.2.4 Vakzinierung mit dendritischen Zellen

Auf Grund der zentralen Rolle der DC bei der Entstehung einer Immunantwort ist sie ein vielversprechender Ansatzpunkt für neue Therapiestrategien durch Immunisierung, beispielsweise im Bereich der Tumorthherapie.

So fand 1996 die erste Tumor-Vakzinierung mit DCs am Menschen mit gutem Erfolg statt (Hsu et al. 1996), nachdem erste Versuche hierzu in der Maus 1995 durchgeführt wurden (Mayordomo et al. 1995). Vier Patienten mit follikulärem B-Zell Lymphom wurden mit Tumor-Antigen beladenen DCs geimpft, hiervon erfuhr zwei eine komplette und einer eine partielle Tumorregression. 1998 wurden dann die ersten Tumorstimmungen mit DCs, welche *in vitro* mittels IL-4 und GM-CSF generiert wurden, unternommen (Nestle et al. 1998).

Während im Menschen durch die Injektion aktivierter DCs eine Immunreaktion gegen ein bestimmtes Antigen ausgelöst werden kann (Dhodapkar et al. 1999), lässt sich durch die Verabreichung unreifer DCs Toleranz gegenüber bestimmten Antigenen hervorrufen (Dhodapkar et al. 2001).

Entsprechend kann uns das Wissen über DCs nicht nur helfen, neue Ansätze in der Tumorthherapie zu finden, sondern auch, vor allem in Kombination mit dem Wissen über ihr Zusammenspiel mit regulatorischen T-Zellen, zur Entwicklung neuer Therapien gegen Autoimmunkrankheiten, Allergien und Transplantatabstoßung helfen (Steinman and Pope 2002, Steinman and Banchereau 2007, Belkaid and Oldenhove 2008, Pulendran et al. 2010).

1.3 Regulatorische T-Zellen

Tada bezeichnete 1997 das Immunsystem als ein Supersystem, also ein höchst komplexes System mit der Notwendigkeit, sich selbst zu regulieren (Tada 1997). Erste Überlegungen über Immunregulation und die Rolle von T-Lymphozyten darin fanden schon in den 70er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts statt (Gershon and Kondo 1970, Golub 1981). 1982 entdeckte Sakaguchi, dass sich Autoimmunität in neonatal thymektomierten Mäusen durch Zufuhr von CD4⁺ T-Lymphozyten verhindern ließ, was darauf schließen ließ, dass zur Immunsuppression fähige Zellen in der CD4⁺ Zellpopulation enthalten sein müssen (Sakaguchi et al. 1982). Weitere Untersuchungen von Sakaguchi führten dann 1995 zur Entdeckung dieser spezifischen T-Lymphozyten

Subpopulation. Sie exprimieren den IL-2 Rezeptor CD25 und sind dazu fähig, die immunologische Selbsttoleranz zu erhalten. Sie wurden regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen) bezeichnet und machen etwa 5 bis 10% der peripheren CD4+ T-Zellen aus (Sakaguchi et al. 1995).

Das 1982 von Sakaguchi durchgeführte Experiment erschließt sich bei Betrachtung der Funktion des Thymus für die Entwicklung von T-Lymphozyten. In ihm werden T-Zellen mit T-Zell-Rezeptoren, die eine hohe Affinität zu Selbstantigenen aufweisen depletiert (Kappler et al. 1987, Kisielow et al. 1988). Fällt diese Negativselektion aus, kommt es durch ständige Selbstantigen Erkennung zur Autoimmunität.

2003 wurde der bislang wichtigste Funktionsmarker von T_{reg} -Zellen entdeckt: der Transkriptionsfaktor *Forkhead-box-protein P3* (FoxP3). Über erzwungene Expression von FoxP3 in konventionellen T-Zellen mittels retroviralen Vektoren konnte ein suppressiver, T_{reg} -ähnlicher Phänotyp erzeugt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass FoxP3 zur Entwicklung von T_{reg} -Zellen aus Knochenmarkvorläuferzellen essentiell ist (Fontenot et al. 2003, Hori et al. 2003).

Wie wichtig die T_{reg} -Zellen für das normal funktionierende Immunsystem sind, sieht man an Mäusen, die eine Mutation im FoxP3 Gen aufweisen, den „*Scurfy* Mäusen“ (Brunkow et al. 2001). Diese Mutation entstand spontan in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts und führte zu einem Phänotyp ausgeprägtesten systemischer Autoimmunität, unter anderem mit schorfiger (engl. *scurfy*) Haut und führte innerhalb weniger Wochen post partum zum Tode (Ramsdell and Ziegler 2014). Eine Mutation des FoxP3 Gens beim Menschen führt zu einem ähnlichen Krankheitsbild mit Entwicklung von Typ 1 Diabetes, Autoimmun-Thyreoiditis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: dem Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal vererbtem (IPEX) Syndrom (Bennett et al. 2001).

1.3.1 Entstehung und Einteilung

Die Population der T_{reg} -Zellen lässt sich in zwei Gruppen unterteilen: zum einen in die, den Hauptteil ausmachenden „natürlichen“ T_{reg} (nT_{reg}) - Zellen, die im Thymus als Selbstantigen-aktivierte, reife T-Zellen entstehen. Die zweite Gruppe der T_{reg} -Zellen wird von den, in der Peripherie unter bestimmten Bedingungen „induzierten“ T_{reg} (iT_{reg}) – Zellen mit Selbstantigen oder harmlose Umweltantigene erkennenden T-Zell-Rezeptoren gebildet (Josefowicz and Rudensky 2009).

Bei der Entstehung der nT_{reg}-Zellen im Thymus spielt die T-Zell-Rezeptor Bindung an Selbstantigene eine entscheidende Rolle. CD4⁺ CD8⁻ Thymozyten, mit mittelstarker Affinität zu Selbstantigenen haben die größte Wahrscheinlichkeit sich zu T_{reg}-Zellen zu entwickeln (Josefowicz et al. 2012). In den letzten Jahren haben sich die Hinweise darauf gemehrt, dass zusätzlich zur und unabhängig von der FoxP3 Expression auch spezifische epigenetische Veränderungen essentiell für die T_{reg}-Zell-Entwicklung sind (Ohkura et al. 2013).

Die zweite Gruppe der T_{reg}-Zellen, die iT_{reg}-Zellen lassen sich in der Peripherie unter TGF- β und IL-2 Einfluss induzieren (Chen et al. 2003). Längerfristige niedrig-dosige Antigenstimulation sowie nur mäßige Costimulation sind entscheidende Faktoren die zur iT_{reg}-Zell Entstehung führen (Josefowicz and Rudensky 2009). Sie exprimieren, wie auch die nT_{reg}-Zellen, FoxP3. Daneben gibt es aber noch zwei weitere induzierbare regulatorische T-Zell-Populationen, die nicht FoxP3 exprimieren: TGF- β produzierende T_h-3-Zellen (Faria and Weiner 2005) und IL-10 produzierende T regulatorische 1 (Tr1) Zellen (Roncarolo et al. 2006).

Zusätzlich zur Unterscheidung auf Grund ihrer Entstehung lassen sich T_{reg}-Zellen an Hand ihres aktuellen Funktionszustandes in drei Gruppen einteilen: zentrale, Effektor- und im peripheren Gewebe befindliche T_{reg}-Zellen. Zentrale T_{reg}-Zellen halten sich in der Blutstrombahn und sekundären lymphatischen Organen auf und werden auch als „ruhende“ oder „naive“ T_{reg}-Zellen bezeichnet. Sie haben vergleichsweise geringe suppressive Aktivität und ihr Antigen-Kontakt liegt tendenziell länger zurück. Im Unterschied hierzu hatten die Effektor T_{reg}-Zellen vor kurzem Antigen-Kontakt und sind entsprechend suppressiver. Auch sie befinden sich in der Blutstrombahn und den sekundären lymphatischen Organen, zeigen aber zusätzlich auch Migration in nicht-lymphatischen Geweben. Die Gruppe der in peripheren Geweben befindlichen T_{reg}-Zellen hält sich dagegen vor allem in nicht lymphatischem Gewebe, wie zum Beispiel dem Darm auf (Liston and Gray 2014).

1.3.2 Mechanismen der Suppression

T_{reg}-Zellen dienen der Suppression von „irrtümlichen“, weil gegen den eigenen Organismus gerichteten Immunreaktionen sowie der Regulation übermäßiger Immunantworten (Sakaguchi et al. 2008, Rudensky 2011).

1995 hatte Sakaguchi CD25 als ersten Marker für T_{reg}-Zellen identifiziert. Dies ist der Rezeptor für IL-2, welches essentiell für das Überleben aktivierter T-Zellen ist. Durch die starke Expression von CD25 auf T_{reg}-Zellen können diese den aktivierten T-Zellen IL-2 entziehen und sie damit in die Apoptose führen (Thornton and Shevach 1998, Pandiyan et al. 2007).

Die beiden Oberflächenmoleküle CD39 und CD73 wandeln meist von Zelltod stammendes immunstimulierendes Adenosin-Triphosphat (ATP) in Adenosin-Monophosphat (AMP) und dieses dann in Adenosin um, welches wiederum immunsuppressiv auf T_H-Zellen wirkt (Kobie et al. 2006, Borsellino et al. 2007). Des Weiteren sind T_{reg}-Zellen über direkte Sekretion von IL-10 (Hara et al. 2001), IL-35 (Collison et al. 2007) und TGF- β (Letterio and Roberts 1998) immunsuppressiv. In Bezug auf zytotoxische T-Zellen können T_{reg}-Zellen durch Sekretion von Zelllyse-vermittelndem Granzym A und B immunsuppressiv wirken (Katakai et al. 2013).

Zwei Moleküle, die nur durch direkten Kontakt mit DCs immunsuppressiv wirken können sind das *Lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3) und der *T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT). LAG-3 ist ein homologes Oberflächenmolekül zu CD4 und bindet an MHC II. Hierdurch können T_{reg}-Zellen die Aktivierung von DCs verhindern (Liang et al. 2008). Über TIGIT wird die IL-10 und TGF- β Produktion in DCs angeregt und so ein immunsuppressives Milieu erzeugt (Yu et al. 2009).

Ein ganz entscheidendes Molekül für die T_{reg}-Zell-Funktion ist das *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4). Es ist homolog zu CD28, bindet CD80 und CD86 und wird auch auf aktivierten T-Zellen hochreguliert. Es wirkt immunsupprimierend und dient dort einem negativen Feedback Mechanismus (Linsley et al. 1991, Walunas et al. 1994). Auf T_{reg}-Zellen wird CTLA-4 konstitutiv exprimiert und ist essentiell für ihre immunsuppressive Funktion, wie unter anderem an *in vivo* Studien zu sehen ist, bei denen ein blockierender Antikörper gegen CTLA-4 zur Entstehung gravierender Autoimmunität führte (Read et al. 2000, Salomon et al. 2000, Takahashi et al. 2000). Durch CTLA-4 können T_{reg}-Zellen CD80 und CD86 auf DCs in einem Kontakt-abhängigen Mechanismus trans-endozytieren und so die Immunogenität von ihnen entscheidend herabsetzen (Qureshi et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich eine Einteilung in vier grundlegende Suppressionsmechanismen vornehmen: Zytokin-vermittelt, Zelllyse-vermittelte Suppression, Suppression durch Störung des Metabolismus und Suppression durch DC-T_{reg}-Zell Interaktion (Vignali et al. 2008) (siehe Abbildung 1, Seite 10).

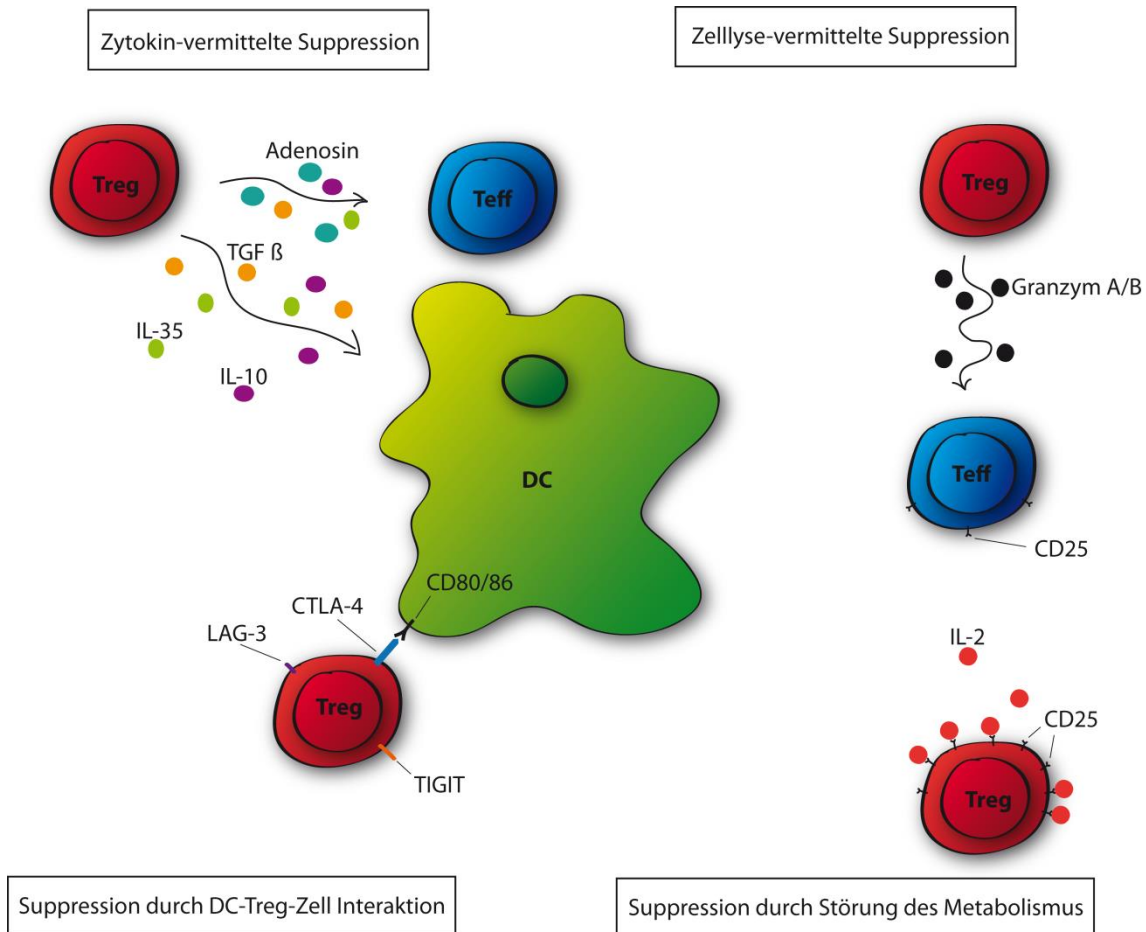


Abbildung 1: Schematische Darstellung der vier grundlegenden Funktionsweisen von T_{reg}-Zellen
 T_{reg}-Zellen können durch Zytokine (links oben), Zelllyse (rechts oben), Störung des Metabolismus (rechts unten) und durch Interaktion mit DCs (links unten) immunsuppressiv wirken. (Modifiziert nach Vignali et al. 2008)

1.4 Chemokine

Der Begriff Chemokine setzt sich zusammen aus „chemotaktische Zytokine“ und es handelt sich hierbei um zelluläre „Lockstoffe“, die die Migration von Immunzellen maßgeblich beeinflussen. Es gibt etwa 50 Chemokine und 20 dazugehörige Chemokinrezeptoren (Griffith et al. 2014). Allgemein lassen sie sich an Hand der Struktur eines konservierten drei Zysteine beinhaltenden Aminosäuremotives in CC und CXC Chemokine und an Hand ihrer Funktion in homöostatische, induzierbare/inflammatorische und duale Chemokine einteilen (Moser et al. 2004, Rot and von Andrian 2004). Während man zu Beginn ihrer Entdeckung dachte, sie wären vor allem für die Koordination des angeborenen Immunsystems wichtig, hat sich mittlerweile herausgestellt, dass sie eine mindestens genau so wichtige Rolle im adaptiven Immunsystem wahrnehmen.

1.4.1 Die Funktion von Chemokinen

Chemokine steuern die Verteilung von Immunzellen in lymphatischen Organen und der Peripherie. Beispielsweise exprimieren naive T-Lymphozyten CCR7 und werden über deren Liganden CCL19 und CCL21 zunächst in die T-Zell-Zonen von Lymphknoten gelockt und optimieren dort die Suche nach einer aktivierten DC mit passendem Antigenen für ihren T-Zell-Rezeptor (Forster et al. 1999, Worbs et al. 2007). Darüber hinaus spielen CCL19 und CCL21 auch eine entscheidende Rolle bei der Migration von aktivierten DCs zum Lymphknoten (Martín-Fontecha et al. 2003).

1.4.2 Die Chemokine CCL22 und CCL17

Das Chemokin CCL (*Chemotactic cytokine ligand*) 17 wurde 1996 von Imai et al. das erste Mal beschrieben. Er entdeckte, dass es konstitutiv im Thymus und nach Stimulation induzierbar in peripheren Blutmonozyten exprimiert wird sowie an T-Zellen bindet (Imai et al. 1996). Daher leitete sich auch der ursprüngliche Name für CCL17 *Thymus and activation regulated chemokine* (TARC) ab. Imai, sowie Lieberam und Förster fanden 1999 heraus, dass CCL17 von DCs im Lymphknoten und in der Lunge produziert wird (Imai et al. 1999, Lieberam and Forster 1999). Auch Fibroblasten, vor allem korneale und dermale, produzieren CCL17 (Kumagai et al. 2000, Fukuda et al. 2003).

1997 beschrieben Godiska et al. die Entdeckung des *Macrophage-derived chemokine* (MDC), das als CCL22 katalogisiert wurde. CCL22 wird vor allem in Makrophagen und DCs, im Thymus, sowie schwächer in der Lunge und der Milz exprimiert (Godiska et al. 1997). Auch aktivierte B- (Schaniel et al. 1998) und T-Lymphozyten (Vulcano et al. 2001) produzieren es. Die potentesten CCL22 Produzenten sind allerdings DCs (Vulcano et al. 2001). Über die Dipeptidyl-Peptidase-IV (CD26) kann CCL22 gespalten werden, was wahrscheinlich einem negativen Feedback-Mechanismus dient (Proost et al. 1999).

Bei der Produktion sowohl von CCL22, als auch von CCL17 durch DCs spielt der Aktivierungszustand eine entscheidende Rolle. Beide Chemokine werden von einer reifen DC in wesentlich größeren Mengen freigesetzt als von einer unreifen DC (Lieberam and Forster 1999, Sallusto 1999).

1997 und 1998 konnten Imai et al. zeigen, dass CCR (*Chemotactic cytokine receptor*) 4 der, bis heute, einzig bekannte Rezeptor für CCL22 und CCL17 ist (Imai et al. 1997, Imai

et al. 1998). Ein Jahr darauf zeigte die selbe Gruppe, dass T_H -2-Zellen durch CCL22 und CCL17 zur Migration angeregt werden können (Imai et al. 1999), allerdings müssen sie zuvor aktiviert worden sein, um CCR4 entsprechend zu exprimieren (D'Ambrosio et al. 1998, Tang and Cyster 1999). 2001 wurde gezeigt, dass unter homöostatischen Umständen, also ohne aktivierte T_H -2-Zellen, CCR4 hauptsächlich auf T_{reg} -Zellen exprimiert ist und im Vergleich mit anderen T_H -Zellen dessen Liganden spezifisch auf T_{reg} -Zellen chemotaktisch wirken (Iellem et al. 2001).

Mit diesen Erkenntnissen in Einklang stehend spielen die beiden Chemokine CCL22 und CCL17 eine wichtige Rolle in Erkrankungen wie Allergien (Romagnani 2002, Hammad et al. 2003), der Atopischen Dermatitis (Vestergaard et al. 1999, Vestergaard et al. 2000) und entzündlichen Darmerkrankungen (Jugde et al. 2001). CCL22 ist darüber hinaus auch bei Asthma von Bedeutung (Pilette et al. 2004) und CCL17 bei Morbus Hodgkin (van den Berg et al. 1999).

Auch in der Infektionsimmunologie sind die beiden Chemokine von Bedeutung. So erzeugt das Hepatitis C Virus über eine Induktion von CCL22 und CCL17 und damit Anlockung von regulatorischen T-Zellen ein immunsuppressives Milieu, um dem Immunsystem zu entkommen (Riezu-Boj et al. 2011).

Ganz ähnlich wird die T_{reg} -Zell anlockende Wirkung von CCL22 und CCL17 von Tumoren ausgenutzt. Curiel et al. konnten dies 2004 das erste Mal an Hand von humanen ovariellen Tumoren zeigen, die über CCL22-vermittelte T_{reg} -Zell Attraktion eine Immunsuppression im Bereich des Tumors erreichen und so einer gegen den Tumor gerichteten Abstoßungsreaktion entgehen konnten (Curiel et al. 2004). Für Magen- und Ösophaguskarzinome konnte eine Korrelation von intratumoralen CCL22 und CCL17 mit Tumor-assoziierten T_{reg} -Zellen gezeigt werden (Mizukami et al. 2008, Maruyama et al. 2010). Gobert fand 2009 heraus, dass Tumor-infiltrierende T_{reg} -Zellen auch in Mammakarzinomen mit der CCL22 Produktion korrelieren und mit schlechterem Gesamtüberleben einhergehen (Gobert et al. 2009).

2 Zielsetzung

Im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnten haben sich dendritische Zellen zunehmend zu einer Schlüsselfigur innerhalb des Immunsystems herauskristallisiert (Steinman and Banchereau 2007, Satpathy et al. 2012, Steinman 2012, Hammer and Ma 2013). Bei der Vergabe des Nobelpreises 2011 an Ralph Steinman bezeichnete das Nobelpreiskomitee sie als die „Torwächter des Immunsystems“, da sich an ihnen maßgeblich entscheidet, ob sich gegen ein bestimmtes Antigen eine Immunantwort entwickelt und wenn ja, welche dies genau sein wird (Nobelassembly 2011). Gleichzeitig spielt die Regulation dieses Prozesses eine ganz entscheidende Rolle. Dies zeigt sich eindrücklich am Beispiel von Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungsreaktionen und dem Entrinnen vieler Tumore vor dem Immunsystem. Regulatorische T-Zellen spielen hierbei eine zentrale Rolle (Sakaguchi et al. 2010, Rudensky 2011, Josefowicz et al. 2012).

Wie sich herausgestellt hat, ist für die Funktion von regulatorischen T-Zellen die Kontaktformation mit dendritischen Zellen von äußerster Wichtigkeit (Tang et al. 2006, Onishi et al. 2008, Wing et al. 2008, Sakaguchi et al. 2009, Sakaguchi et al. 2010, Wing and Sakaguchi 2010). Die Mechanismen, die zur Kontaktbildung von regulatorischen T-Zellen mit dendritischen Zellen beitragen, sind bislang nicht ausreichend verstanden.

Der Chemokinrezeptor CCR4 wird unter homöostatischen Bedingungen in relevantem Ausmaß und selektiv auf regulatorischen T-Zellen exprimiert (Iellem et al. 2001). Die einzigen Liganden von CCR4, CCL22 und CCL17, werden hauptsächlich von dendritischen Zellen produziert (Godiska et al. 1997, Imai et al. 1999, Lieberam and Forster 1999, Vulcano et al. 2001). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Attraktion von regulatorischen T-Zellen und die Kontaktformation mit dendritischen Zellen über CCL22 und CCL17 vermittelt werden.

Es sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Führen CCL22 und CCL17, welche von DCs produziert werden, zu vermehrter Kontaktformation mit T_{reg}-Zellen?
2. Ist dieser Effekt im Vergleich zu anderen T-Zellen spezifisch für T_{reg}-Zellen?
3. Welche Bedeutung haben CCL22 und CCL17 für die Funktion von DCs *in vivo*?
4. Lassen sich die beobachteten Befunde auf humane DCs und T_{reg}-Zellen übertragen?

3 Material

3.1 Geräte

Amaxa Nucleofector II	Lonza GmbH (Köln, D)
Begasungsbrutschrank	Heraeus (Hanau, D)
CTI-Controller 3700 digital	PeCon GmbH (Erbach, D)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACS Canto II	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Genepulser Xcell	Biorad (München, D)
Heraeus Multifuge 3L-R Zentrifuge	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Innova® 44 Incubator Shaker	Eppendorf (Hamburg, D)
Konfokales Mikroskop TCS SP5	Leica (Wetzlar, D)
Lamin Air (HB 244 8)	Heraeus (Hanau, D)
Light Cycler	Roche (Mannheim, D)
Bromma 2011 Macrovue transilluminator	LKB Instruments (Mt Waverley, Vic, AU)
Mikroskop Primo Vert	Zeiss (Jena, D)
MiniMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mithras LB 940 ELISA Reader	Berthold Technologies (Bad Wildbad, D)
Multifuge 3L-R	DJB Labcare Ltb (Buckinghamshire, GB)
NanoPhotometer P360	Implen GmbH (München, D)
pH-Meter	WTW (Weilheim, D)
Power Supply 200/2.0 Spannungsgerät	Biorad (München, D)
QuadroMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Scintillation Counter	Biorad (München, D)
Sorval Ultracentrifuge Combi	DuPont (Bad Homburg, D)
Tempcontrol 37-2	PeCon GmbH (Erbach, D)
Thermocycler Modell T3	Biometra (Göttingen, D)
Thermocycler RoboCycler Gradient 40	Stratagene (Heidelberg, D)
Thermomixer® compact	Eppendorf (Hamburg, D)
Vortex VF2	Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Waage (LP 6209)	Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifuge (5415 R)	Eppendorf (Hamburg, D)

3.2 Chemikalien und Lösungen

Agarose LE	Biozym (Hess Oldendorf, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Germany
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Geneticin g-418 Sulfat	Gibco BRL (Paisley, GB)
Heparin-Natrium 25.000 I.E./5 ml	Braun AG (Melsungen, D)
Paraformaldehyde (PFA)	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
To-Pro-3-Iodid (TOPRO-3)	Molecular Probes (Leiden, NL)
Typ F Immersionsöl	Leica (Wetzlar, D)
FACSFlow, FACSClean, FACSShutdown	BD bioscience (Heidelberg, D)
Tween® 20	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Isoflurane (Forene®)	Abbott (Zug, CH)
Lipofectamine™ 2000	invitrogen (Carlsbad, USA)
Transfection Reagent	
MolTaq DNA Polymerase	Molzym (Bremen, D)
Pfu Ultra Fusion HS	Stratagene (Waldbronn, D)
Tween 20	Roth (Karlsruhe, D)
Trizol Reagenz	Ambion (Lifetechnologies)
dNTP Mix, 10mM	invitrogen (Carlsbad, USA)
Ethidiumbromid	
O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific (Waltham, USA)
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Buffer O	Thermo Scientific (Waltham, USA)
T4 Ligase buffer	Fermentas (St. Leon-Rot, D)

3.3 Reagentsätze / Kits

MACS:

CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit für murine Zellen	Miltenyi Biotech GmbH (Bergisch Gladbach, D)
CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech GmbH

für humane Zellen

(Bergisch Gladbach, D)

FACS:

Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set

eBioscience (Frankfurt, D)

cDNA Umschrieb:

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

Fermentas (St. Leon-Rot, D)

JetQuick Gel Extraktion

Genomed (Löhne, D)

GenJET Plasmid Miniprep Kit

Thermo Scientific (Waltham, USA)

PureYield™ Plasmid Maxiprep System

Promega (Madison, USA)

Membranfarbstoffe für Zellfärbung:

PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for
General Cell Membrane Labeling

Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

PKH67 Red Fluorescent Cell Linker Kit for
General Cell Membrane Labeling

Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Human Dendritic Cell Nucleofector® Kit

Lonza GmbH (Köln, D)

Mouse Dendritic Cell Nucleofector® Kit

Lonza GmbH (Köln, D)

3.4 Materialien für die Zellkultur

1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-
indodicarbocyanine-5,5'-disulfonic
acid (DiIC₁₈(5)-DS)

Invitrogen, Life Technologies GmbH
(Damrstadt, D)

β-Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

DNAse I Typ IV

Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Dulbecco's modified Eagle's medium
(DMEM), *high glucose*

PAA (Pasching, Ö)

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Fetales Kälberserum (FCS)

Gibco BRL (Karlsruhe, D)

CELLview™ Glasbodenschale

Greiner Bio One (Frickhausen, D)

Kollagenase

Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

MEM-NEAA (*Non-essential amino acids*)

Gibco BRL (Karlsruhe, D)

Natrium Pyruvat

PAA (Pasching, Ö)

Opti-MEM® *Reduced Serum Medium*

Gibco BRL (Paisley, GB)

Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA (Pasching, Ö)
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	PAA (Pasching, Ö)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)	PAA (Pasching, Ö)
1640 medium	
Scraper	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Medium 199	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tryptan Blau	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin	PAA (Pasching, Ö)
<i>gene juice</i>	Novagen, Merck (Darmstadt, D)

verwendete gemischte Medien:

T-Zell-Medium:

RPMI 1640
 10% FCS
 2 mM L-Glutamin
 100 IU/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin
 1 mM Natrium Pyruvat
 1% MEM-NEAA
 50µM β-Mercaptoethanol in RPMI

DC 2.4 Medium:

10% FCS
 2 mM L-Glutamin
 100 IU/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin
 1 mM Natrium Pyruvat
 1% MEM-NEAA

BMDC-Medium:

RPMI 1640
 10% FCS
 2 mM L-Glutamin
 100 IU/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin

DC 2.4 Einfriermedium:

50% DMEM
 40% FCS
 10% DMSO

3.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren, Peptide und Stimulantien

Bezeichnung	Hersteller
murines IL-2	Peptotech GmbH (Hamburg, D)
murines IL-4	Peptotech GmbH (Hamburg, D)
murines GMCSF	Peptotech GmbH (Hamburg, D)
humanes IL-4	Peptotech GmbH (Hamburg, D)
humanes GMCSF	Peptotech GmbH (Hamburg, D)

CpG 1826 (CpG)	Coley (Langenfeld, D)
Imject Alum	Thermo Scientific (Waltham, USA)
TGF- β	R&D Systems (Minneapolis, USA)
OVA 257-264 (SIINFEKL)	Invivogen (Toulouse, F)

3.6 *short-interfering RNAs (siRNAs)*

Mm_Ccl22_3 FlexiTube siRNA	Qiagen (Hilden, D)
Mm_Ccl17_1 FlexiTube siRNA	Qiagen (Hilden, D)
Hs_Ccl22_3 FlexiTube siRNA	Qiagen (Hilden, D)
Hs_Ccl17_3 FlexiTube siRNA	Qiagen (Hilden, D)
Negative control siRNA	Qiagen (Hilden, D)

3.7 Antikörper

FACS-Antikörper:

anti-CD4 (PE)	BioLegend (San Diego, USA)
anti-foxp3 (pacific blue)	BioLegend (San Diego, USA)
anti-CD25	BioLegend (San Diego, USA)
anti-IFN- γ (pacific blue)	BioLegend (San Diego, USA)
H-2Kb OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Pentamere (PE)	Proimmune Ltd (Oxford, GB)

andere Antikörper:

anti-CD3-CD28 Beads	Invitrogen (Darmstadt, D)
---------------------	---------------------------

3.8 Enzyme

PFU Ultra II	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, D)

Restriktionsendonukleasen:

Not I	(Thermo Scientific (Waltham, USA))
-------	------------------------------------

Erkennungssequenz

Restriktionsschnitt

5' -GCGGCCGC-3'	5' -GC	GGCCGC-3'
3' -CGCCGGCG-5'	3' -CGCCGG	CG-5'

Age I

(Thermo Scientific (Waltham, USA))

Erkennungssequenz

Restriktionsschnitt

5' -ACCGGT-3'	5' -A	CCGGT-3'
3' -TGGCCA-5'	3' -TGGC	A-5'

3.9 Primer

CCL17 Agel For

3' -ACCGGTCTCGAGATGAAGACCTTCAC-5'

CCL17 NotI Rev

3' -GCGGCCGCTCATGGCCTTGGGTTTTTC-5'

3.10 DC2.4 Zelllinie

Die DC2.4 Zellen sind retroviral immortalisierte, unreife dendritische Zellen auf einem C57BL/6 Hintergrund (Shen et al. 1997). Sie wurden dem Labor freundlicher Weise von Hajime Kono, Department of Pathology, University of Massachusetts Medical School (USA) zur Verfügung gestellt.

3.11 Versuchstiere

Für die vorliegende Arbeit wurden C57 BL/6 (Black 6) Mäuse (*mus musculus*) von Harlan Laboratories (Rossdorf, D) verwendet. Die Tiere waren bei Verwendung zwischen 6 und 12 Wochen alt. Des Weiteren wurde eine CCL22 Knockout Maus (CCL22 -/-) genutzt, welche vom *KOMP Repository Knockout Mouse Project* stammte, einem von der NIH (*National Institutes of Health*) gegründeten Projekt. Die Genregion von CCL22 wurde durch homologe Rekombination durch das Reporter-Gen lacZ, sowie ein Selektionsfragment zur Selektion mit Neomycin ersetzt. Die CCR4 Knockout Maus

(CCR4 -/-) wurde dem Labor freundlicher Weise von Prof. Dr. Anne Krug (Institut für Immunologie, LMU München) zur Verfügung gestellt.

3.12 Software

Adobe Creative Suite

Adobe Systems (San Jose, USA)

BD FACSDiva

BD Biosciences (San Diego, USA)

GraphPad Prism 5

GraphPad Software (La Jolly, USA)

FlowJo v7.6.5 (Windows)

Tree Star (Ashland, USA)

Bitplane Imaris

Bitplane AG (Zürich, CH)

Microsoft Office

Microsoft (Redmond, USA)

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem 5%igen CO₂-Anteil am Luftgemisch. Sämtliche Experimente mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

4.1.2 Zellzahlbestimmung

10 µl der zu untersuchenden Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblaulösung verdünnt. 10 µl davon wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dazu wurden vier Quadranten betrachtet und die mittlere gesamte Zellzahl bestimmt.

4.1.3 Zellisolation und -aufreinigung

4.1.3.1 Isolation muriner Splenozyten

Die Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Milzen wurden entnommen und in sterilem PBS auf Eis gelagert. In die Organe wurde 1 ml einer 1 mg/ml Kollagenase und 0,05 mg/ml enthaltenen DNase Lösung injiziert. Anschließend wurden sie mit einem Skalpell zerkleinert und für 15 Minuten bei 37°C im Schüttler bei 800 Umdrehungen pro Minute (rpm) inkubiert. Dieser Verdau diente der Maximierung der Zellgewinnung. Um eine möglichst Gewebefreie Zellsuspension zu erhalten, wurden die verdauten Milzen durch ein 40 µm Nylonnetz gedrückt. Nach Zentrifugation (400 G, 7 Minuten), wurde das Zellpellet für 2 Minuten in 4 ml Erylyseflüssigkeit gelöst. Nach Zugabe von 40 ml PBS wurde die Suspension zentrifugiert (400 G, 7 Minuten) und das Pellet in 20 ml T-Zell-Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 4.1.2, Seite 21).

4.1.3.2 Isolation murinen Knochenmarks

Die Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Femur und Tibia Knochen wurden entnommen, von Muskulatur befreit und in sterilem PBS auf Eis gelagert. Die Enden der Knochen wurden mit einer Schere an beiden Enden leicht angeschnitten, um das Herausspülen des Knochenmarks mittels BMDC-Medium zu ermöglichen. Zur Vereinzelung der Zellen diente mehrmaliges Aufsaugen des Zellmaterials durch eine Spritze. Nach einer Zentrifugation (400 G, 7 Minuten) wurden die pelletierten Knochenmarkszellen für 4 Minuten in 2 ml Erylyseflüssigkeit gelöst. Nach Zugabe von 40 ml PBS und damit Stopp der Erylyse wurde die Suspension zentrifugiert (400 G, 7 Minuten) und das Pellet in 10 ml T-Zellmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 4.1.2, Seite 21).

4.1.3.3 Isolation humaner peripherer Blutlymphozyten und Monozyten

Aus 150 ml heparinisiertem Vollblut (100 µl Heparin auf 10 ml Blut) wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) durch Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Dazu wurde das Vollblut mit 0,9% Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lsg.) im Verhältnis 1 zu 1 verdünnt und in einem 50 ml fassenden Röhrchen vorsichtig auf 15 ml Biocoll-Lösung geschichtet. Hierbei durften sich die beiden Flüssigkeiten nicht vermischen. Anschließend wurden die Röhrchen für 20 Minuten bei 1000 G und 20°C zentrifugiert (ohne zugeschaltete Bremse). Darauf folgend fand man folgende Schichtung von oben nach unten vor: Blutplasma, weißlicher Ring aus PBMCs, Biocoll-Flüssigkeit, Erythrozyten. Die weiße PBMC-Schicht wurde abgenommen und mit 40 ml NaCl-Lsg. verdünnt. Nach dreimaligem Waschen der Zellen in NaCl-Lsg. (erste Zentrifugation: 520 g, 20°C, 10 min, zweite und dritte Zentrifugation: 400 g, 4°C, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml T-Zellmedium gelöst und die Zellzahl bestimmt (siehe 4.1.2, Seite 21).

Wenn zur Generierung humaner von Blutmonozyten abstammender dendritischer Zellen (hBMDCs) anschließend Monozyten isoliert werden sollten, wurden die PBMCs auf eine Konzentration von 15 Mio/ml in T-Zellmedium eingestellt und in einer (Gesamtvolumen < 30 ml), beziehungsweise zwei (Gesamtvolumen > 30 ml) 175 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank kultiviert. Nach einer Stunde waren die Monozyten adhärent, die restlichen PBMCs wurden im Überstand abgenommen. Nach zweimaligem

Waschen der Kulturflasche mit PBS (RT), konnten die Monozyten weiterverwendet werden (siehe 4.1.4.2 *In vitro* Generierung humaner blood-monocyte-derived-dendritic-cells (hBMDCs), Seite 24).

4.1.3.4 Zellaufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung

Die Methode des *Magnetic-activated cell sorting* (MACS) dient der Selektion von Zellen durch Antikörper, die gegen bestimmte Oberflächenmoleküle gerichtet und an magnetische Partikel gekoppelt sind. Die in MACS-Puffer (2 mM EDTA und 10% FCS enthaltendes PBS) gelösten Zellen wurden mit Antikörper markiert und in einem starken magnetischen Feld auf eine Säule mit magnetischen Kügelchen gegeben. Die mit magnetischen Antikörpern markierten Zellen verbleiben in der Säule, während die übrigen Zellen unter der Säule aufgefangen werden können. Nach Entfernung aus dem magnetischen Feld können die Antikörper-gebundenen Zellen durch kräftiges Durchspülen mit einem Stempel aus der Säule gelöst werden.

Dieser Prozess kann zur Gewinnung der mittels Antikörper markierten Zellen (Positivselektion) oder der unmarkierten Zellen (Negativselektion) durchgeführt werden. Zur Isolierung muriner T_{reg}-Zellen wurden zunächst alle CD4⁺ Zellen mittels Negativselektion gewonnen, um anschließend die CD25⁺ regulatorischen T-Zellen durch Positivselektion zu gewinnen. Zur Isolierung humaner T_{reg}-Zellen wurden zunächst alle CD4⁺ CD127⁻ Zellen mittels Negativselektion gewonnen, um anschließend die CD25⁺ regulatorischen T-Zellen durch Positivselektion zu gewinnen.

4.1.4 Zellgenerierung

4.1.4.1 *In vitro* Generierung muriner bone-marrow-derived-dendritic-cells (BMDCs)

Nach der Isolation murinen Knochenmarks (siehe 4.1.3.2, Seite 22) wurden die Zellen aus jeweils einer Maus in 50 ml T-Zellmedium mit 20 ng/ml murinem IL-4 und GM-CSF für 6 Tage kultiviert. Anschließend wurden die flottierenden und leicht adhärenenten Zellen durch Abnehmen des Überstandes und leichtem Abspülen des Flaschenbodens mit Medium geerntet.

4.1.4.2 *In vitro* Generierung humaner blood-monocyte-derived-dendritic-cells (hBMDCs)

Nach der Isolation humaner peripherer Monozyten (siehe 4.1.3.3, Seite 22) wurden aus ihnen mit humanem IL-4 und GM-CSF DCs generiert, wie vorbeschrieben (Sallusto et al. 1995). Die Zellen wurden in einer Konzentration von 15 Mio/ml in T-Zellmedium, welches 500 U/ml IL-4 und 1000 U/ml GM-CSF enthielt, gelöst. Nach 6 Tagen Kultur wurden die flottierenden und leicht adhärenenten Zellen durch Abnahme des Überstandes und leichtem Abspülen des Flaschenbodens geerntet.

4.1.5 Zellfärbungen

Die Färbung der Zellen erfolgte mit den Membranfarbstoffen PKH 26 (rot) und PKH 67 (grün) von Sigma-Aldrich. Die dendritischen Zellen wurden mit PKH 67 gefärbt, die T-Zellen mit PKH 26. Für einen Färbeansatz wurden maximal 10 Mio Zellen verwendet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (400 G, 7 Min, 4°C), während dessen die Zellsuspension in ein 2 ml Röhrchen überführt wurde, wurde der Überstand möglichst komplett abgenommen, da verbleibende Flüssigkeit den Färbeprozess stören kann. Das Röhrchen mit dem Zellpellet wurde sofort auf Eis gestellt. In 250 µl Diluent C wurden 0,5 µl (bei T-Zellen), beziehungsweise 1,0 µl (bei DCs) PKH Farbstoff gelöst. Anschließend wurde das Pellet ebenfalls in 250 µl Diluent C gelöst und beide Ansätze bei Raumtemperatur (RT) vereint. Nach 3 Minuten (bei T-Zellen), beziehungsweise 5 Minuten (bei DCs) wurde die Färbung mit 1 ml T-Zellmedium gestoppt und die Zellsuspension wurde sofort zur weiteren Verdünnung und zum Wechsel des Gefäßes zu 13 ml T-Zellmedium in einem neuen Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden zentrifugiert (400 G, 7 Min, 4°C), in 1 ml T-Zellmedium gelöst und gezählt (siehe 4.1.2, Seite 21). Daraufhin wurde das Röhrchen auf 15 ml T-Zellmedium aufgefüllt und die Zellen wurden zur Erholung für mindestens 2 Stunden im Brutschrank inkubiert.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Extraktion zytoplasmatischer RNA

Um einen komplementären DNA (cDNA) Abschrieb der *messenger RNA* (mRNA) einer Zelle zu ermöglichen, wurde eine Extraktion der zytoplasmatischen RNA durch Trizol

durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen lysiert und zentrifugiert (400 G, 7 Min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,75 ml Trizol Reagenz je 10 Mio Zellen gelöst. Um eine möglichst vollständige Zellyse zu ermöglichen, wurde die Suspension mehrmals Auf- und Abpipettiert. Anschließend wurde nach 5-minütiger Inkubation bei RT 0,2 ml Chloroform je 1 ml Trizol Reagenz hinzugegeben und das Röhrchen für 15 Sekunden geschüttelt. Nach 3 Minuten Inkubation bei RT wurde das Röhrchen zentrifugiert (12.000 G, 15 Minuten, 4°C). Es konnten folgende drei Phasen erkannt werden:

- obere Phase: farblos, wässrig, die RNA enthaltend
- Interphase
- untere Phase: rötlich (Phenol-Chloroform)

Die obere Phase wurde abgenommen und es wurden je 1 ml Trizol, welches bei der Zellyse Verwendung fand, 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben. Nach Inkubation bei RT für 10 Minuten wurde eine Zentrifugation (12.000 G, 10 Minuten, 4°C) durchgeführt. Die RNA war anschließend als Pellet sichtbar. Nach einem Waschschrift (1 ml 75% Ethanol je 1 ml verwendetem Trizol) und einer Zentrifugation (7500 G, 5 Minuten, 4°C) wurde das Pellet angetrocknet. Danach wurde die Probe in 20 µl destilliertem und sterilisiertem Wasser gelöst und für 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend konnte sie direkt weiterverwendet oder bei -80°C gelagert werden.

4.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Spektrometer bestimmt. Hierzu wurden sie in H₂O gelöst und anschließend ein Absorptionsspektrum von 220 bis 320 nm aufgenommen. Einer Optischen Dichte (OD) von 1 entsprechen 50 µg DNA oder 4 µg RNA.

4.2.3 Reverse Transkription

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben wurde das „*Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit*“ von Fermentas verwendet. Hierfür wurden 5 µg der isolierten RNA, 12 µl Nuklease-freies, destilliertes Wasser und 0,5 µg oligo(dT)₁₈ Primer zusammen gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei 70°C und sofortiger Kühlung auf Eis wurde der Ansatz für 5 Sekunden zentrifugiert. Es wurden 2 µl 10mM 2'-Desoxynukleosid 5'-Triphosphate (dNTPs) Mix, 1 µl von 20 U/µl Ribonukleaseinhibitor sowie 4 µl 5x Reaktionspuffer

hinzugegeben. Nach Inkubation für 5 Minuten bei 37°C wurde für den Start 1 µl von 200 U/µl RevertAid™ Reverse Transkriptase hinzugegeben. Anschließend erfolgte der Umschrieb bei 42°C in 60 Minuten und wurde durch 10-minütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Die cDNA wurde entweder direkt verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

4.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lässt sich ein bis zu 10.000 Basenpaare großes spezifisches DNA-Stück aus einer Nukleinsäureprobe amplifizieren. Für die Reaktion werden eine thermostabile DNA-Polymerase, zwei zu den 3' Enden der zu replizierenden DNA-Sequenz komplementäre, jeweils 15-30 Basenpaare lange Oligonukleotidprimer, ein spezieller Reaktionspuffer, sowie 2'-Desoxynukleosid 5'-Triphosphate (dNTPs) benötigt. Im ersten von drei Schritten erfolgt die Denaturierung der DNA-Matrize. Im zweiten Schritt erfolgt die spezifische Anlagerung der Primer an die komplementären Zielsequenzen. Im dritten Schritt erfolgt die Neusynthese der DNA, die sogenannte Elongation. Dieser Zyklus wurde 30-mal wiederholt. Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Bei einer PCR mit Ziel der Implementation des Endproduktes in ein Plasmid wurde mit der PFU Ultra Polymerase gearbeitet, da diese eine Kontrolllese und Exonuklease Aktivität aufweist und damit eine höhere Zuverlässigkeit erreicht werden kann, während bei allen anderen PCRs mit der Moltaq Polymerase gearbeitet wurde.

PCR Ansatz für Moltaq Polymerase:

100 bis 500 pg	DNA
0,25 µM	3'-Primer
0,25 µM	5'-Primer
0,20 µM	Je dNTP
1x	Moltaq Reaktionspuffer
10%	PCR Enhancer Solution
1mM	MgCl ₂
1 U	Moltaq DNA Polymerase

PCR Ansatz für PFU Ultra Polymerase:

100 bis 500 pg	DNA
0,25 µM	3'-Primer
0,25 µM	5'-Primer
0,20 µM	Je dNTP
1x	PFU Ultra II Reaktionspuffer
1,25 U	PFU Ultra DNA Polymerase

Typischer PCR Ablauf:

Dauer	Schritt	Temperatur	
5 Min	Anfangs-Denaturierung	95° C	

20 Sek	Denaturierung	95° C	30 Zyklen
20 Sek	Annealing	65° C	
15 Sek	Elongation	72° C	

3 Min	End-Elongation	72° C	
	Ende	4° C	

4.2.5 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt. Hierzu wurden 200 ml TBE-Puffer mit 3,0 g Agarose bis zum Siedepunkt erhitzt und 7,0 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension in die entsprechende Form gegeben und über mindestens eine Stunde abgekühlt. Das ausgehärtete Gel wurde in die Gelelektrophorese-Kammer überführt und die Kammer mit TBE-Puffer aufgefüllt. Die aufzutrennenden Proben zusammen mit 6-fachem Ladepuffer, sowie 10 µl des DNA-Leiter-Mixes wurden in die Geltaschen gegeben. Zur Auftrennung wurde eine elektrische Spannung von 90 Volt angelegt. Bei Erreichen des oberen Randes des Gels durch die DNA-Leiter wurde die Auftrennung gestoppt, ein Bild im UV-Licht aufgenommen und die entsprechende DNA enthaltende Bande am UV-Transilluminator herausgeschnitten. Durch Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid mit den DNA-Strängen konnten die DNA-Banden unter UV-Bestrahlung

sichtbar gemacht werden. Anschließend wurde die DNA aus dem Gel-Stückchen extrahiert (siehe 4.2.6, Seite 28).

4.2.6 DNA Extraktion aus einem Agarosegel

Nachdem der Auftrennung der PCR Produkte in einem Agarosegel und dem Herausschneiden der entsprechenden Bande erfolgte die Extraktion der DNA mittels dem *JetQuick gel extraction kit*. Hierzu wurden je 100 mg herausgeschnittenem Gel 300 µl L1-Lösung hinzugegeben und beides zusammen bei 50°C für 15 Minuten inkubiert. Alle 3 Minuten wurde das Röhrchen mittels Vortexer gemischt. Die Lösung wurde in eine JetQuick Säule übertragen und diese zentrifugiert (12.000 G, 1 Minute). Die aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule mit 500 µl L2 Lösung geladen und zweimal zentrifugiert (12.000 G, 1 Minute), wobei die aufgefangene Flüssigkeit nach der ersten Zentrifugation verworfen wurde. Anschließend wurde die Säule mit 50 µl H₂O geladen und in einer letzten Zentrifugation (12.000 G, 2 Minuten) die DNA aus der Säule gelöst.

4.2.7 Sequenzeinbau in ein Plasmid

Um eine spezifische Sequenz in ein Plasmid einzubauen, muss die Sequenz durch Wahl entsprechender Primer bei der Vervielfältigung durch PCR Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen aufweisen, die auch an der für die Sequenz vorgesehenen Stelle im Plasmid vorhanden sind. Im Plasmid handelt es sich hierbei um die *multiple cloning site*. Im Fall des für die vorliegende Arbeit durchgeführten Einbaus der CCL17 Sequenz in ein *reverse tetracycline-controlled transcriptional activation* (rtTA-)Plasmid zur Schaffung eines CCL17-Tet-On Systems waren die verwendeten Endonukleasen NotI und AgeI. Für diesen Restriktionsverdau wurden je 10 u der Restriktionsendonukleasen und 10 µg DNA in 1x *buffer O* für 2 Stunden bei 37° C angesetzt. Nach Auftrennung der Ligationsprodukte über Gelelektrophorese (siehe 4.2.5, Seite 27) und DNA Extraktion aus dem Gel (siehe 4.2.6, Seite 28) wurde eine Konzentrationsbestimmung mittels Spektrometer vorgenommen (siehe 4.2.2, Seite 25).

Für die Ligation wurde ein Verhältnis von einzubauender Sequenz zu Vektor von 3 zu 1 benutzt. Die Ligation wurde mit T4 Ligase in T4 Ligase Puffer bei 17° C über Nacht

durchgeführt. Die Ligase wurde durch 5-minütige Inkubation bei 70° C inaktiviert. Nach Abschluss der Ligation wurde das Plasmid kloniert (siehe 4.2.8).

4.2.8 Klonierung eines Plasmides

Für die Klonierung wurden hitzekompetente DH5 α *E.coli* Bakterien benutzt. Zunächst wurden diese transfiziert. Direkt nach dem Auftauen der Zellen wurde das Plasmid hinzugegeben, der Ansatz bei 42° C für 1 Minute inkubiert und wieder auf Eis gegeben. Im Anschluss daran wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltigem LB-Agarplatten ausplattiert, sodass nur die Bakterien mit Plasmid und damit Ampicillin-Resistenz überleben konnten. Im Anschluss daran fand die Plasmidpräparation statt (siehe 4.2.9).

4.2.9 Plasmidpräparation

Für die Plasmidpräparation wurden Klone von der Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte in Ampicillin-haltiger Flüssigkultur vermehrt und es wurde anschließend eine Plasmidisolation mit dem *JetQuick Plasmid Miniprep* von Genomed vorgenommen. Zunächst wurden die Bakterien zentrifugiert (12.000 G, 2 Minuten) und in 250 μ l L1 Lösung resuspendiert. Zur Zellyse wurden 250 μ l L2 Lösung hinzugegeben und vorsichtig durch Wenden gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden zur Neutralisation 350 μ l L3 Lösung hinzugefügt, erneut vorsichtig gemischt und anschließend zentrifugiert (12.000 G, 10 Minuten). Anschließend wurde der Überstand in eine JetQuick Säule überführt und zentrifugiert (12.000 G, 1 Minute). Nach Verwerfung der abzentrifugierten Flüssigkeit wurden 500 μ l G4 Waschlösung auf die Säule gegeben, erneut zentrifugiert (12.000 G, 1 Minute) und nach Entleerung des Auffangröhrchens wieder zentrifugiert (12.000 G, 1 Minute). Nun wurde die in der Säule aufgefangene DNA mit 50 μ l auf 65° C erwärmten, sterilem H₂O und einer letzten Zentrifugation (12.000 G, 2 Minuten) herausgelöst. Das aufgereinigte Plasmid konnte nun für die Virusgenerierung genutzt werden (siehe 4.2.10).

4.2.10 Virusgenerierung und Transfektion

Zur Generierung eines das CCL17-Tet-On-Plasmid enthaltenen Virus wurden 20.000 293T HEK Zellen in 293T HEK Zellmedium (DMEM mit 10% FCS) auf einer 96 well Platte mit 100 μ l je well ausplattiert. Es wurden folgende Transfektionsansätze je well vorbereitet:

1. Ansatz:

0,6 µl *gene juice*

9,4 µl Opti-MEM®

2. Ansatz:

5 µl Plasmid-Mix (100ng delta 8.9 Plasmid, 10ng VSV-G Plasmid und 100ng des CCL17-Plasmides enthaltend)

15 µl Opti-MEM®

Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden die beiden Ansätze vereint und für 25 Minuten bei RT inkubiert. Der erhaltene Transfektionsansatz von 25 µl wurde je auf ein well übertragen und nach einer 24-stündigen Inkubation das Medium auf 30% FCS-haltiges 293T HEK-Zell Medium umgestellt. Nach 36 Stunden wurde der Überstand abgenommen und mittels 0,45 µm Sieb filtriert.

Die abgefilterte Flüssigkeit wurde auf sechs Röhrchen aufgeteilt auf 20% Saccharose geschichtet und ultrazentrifugiert (27.000 G, 2 Stunden, 4° C). Das Viruspellet wurde nach Trocknung vorsichtig in 125 µl DMEM resuspendiert und über Nacht bei 4° C inkubiert.

Zur Transfektion wurde die immortalisierte, unreife dendritische Zelllinie DC2.4 verwendet (Shen et al. 1997). Diese produzieren von sich aus kein CCL17 und CCL22. Für die Infektion mit dem das Tet-On-CCL17-Konstrukt enthaltenen Lentivirus wurden 2500 DC2.4 Zellen je well in einer 96 well Platte ausplattiert und das Medium abgenommen, sobald diese adhärent waren. Nun wurde das Virus-enthaltende DMEM 1 zu 5 verdünnt und je 50 µl davon in ein well gegeben. Nach 24 Stunden wurde auf reguläres DC2.4 Medium gewechselt, bevor nach weiteren 12 Stunden mit der Puromycin Selektion begonnen wurde. Nachdem die Selektion durch schrittweise Erhöhung der Puromycinkonzentration auf 5 µg/ml abgeschlossen war, wurde die induzierbare CCL17 Expression durch Doxycyclin Exposition und anschließend CCL17 ELISA getestet.

Die in dieser Arbeit außerdem verwendeten mittels Tet-On-CCL22-Konstrukt transfizierten DC2.4 wurden von Dr. rer. nat. Moritz Rapp nach dem gleichen Prinzip generiert und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

4.2.11 Knockdown mittels RNA-Interferenz

Die *in vitro* generierten BMDCs (siehe 4.1.4.1 bzw. 4.1.4.2, Seite 23) wurden aus der Zellkulturflasche geerntet, abzentrifugiert (400 G, 7 Minuten), in 10 ml T-Zell Medium gelöst und gezählt. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und auf eine Zellkonzentration von 3 bis 10 Mio / 100 µl T-Zell-Medium eingestellt. Zunächst wurde ein 10 ng siRNA entsprechendes Volumen einer 20 pM siRNA Lösung in die Transfektionsküvette vorgelegt. Auf diesen Tropfen siRNA-Lösung wurden 100 µl BMDC Zellsuspension gegeben. Die Transfektion wurde mit einem Transfektionsgerät von Amaxa bei RT durchgeführt. Nach der Transfektion wurde die Zellsuspension vorsichtig mit einer Pipette aufgesaugt und in 2 ml T-Zell-Medium überführt. Die Zellzählung erfolgte nach frühestens 2 Stunden.

4.3 Enzyme-linked immunosorbent assay

Die Methode des *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) wird zum quantitativen Nachweis eines bestimmten Proteins in einer Lösung verwendet. Hierzu wurden 96 well ELISA-Platten über Nacht bei RT mit 50 µl je well einer PBS Lösung, die einen spezifisch gegen das untersuchte Protein gerichteten Antikörper (*Coating* Antikörper) enthielt, beschichte. Dabei wurde die Platte mit einer Folie abgeklebt, um Verdunstung zu verhindern. Anschließend fand eine Blockierung der unspezifischen Proteinbindung an die Platte mittels 200 µl je well ELISA Block Lösung (PBS mit 10% FCS) statt. Die zu untersuchende Lösung wurde entsprechend der erwarteten Proteinmenge verdünnt und es wurden 50 µl hiervon in 1 well der ELISA-Platte gegeben. Zusätzlich wurde eine Lösung mit bekannter Proteinkonzentration (Standardlösung), die 6 mal jeweils 1 zu 1 mit ELISA Block Lösung verdünnt wurde, auf die Platte pipettiert (ebenfalls jeweils 50 µl je well). Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurde der Überstand verworfen und die Platte dreimal mit jeweils 200 µl ELISA Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween) je well gewaschen. Es erfolgte anschließend eine zweistündige Inkubation mit einem zweiten, spezifisch gegen das zu untersuchende Protein gerichteten, biotinylierten Antikörper (Detektions Antikörper), der in ELISA Block Lösung gelöst wurde (50 µl je well). Nach einem erneuten dreimaligem Waschschrift mit 200 µl ELISA Waschpuffer wurden die Platten mit 50 µl ELISA Block Lösung, welche Streptavidin-Peroxidase enthielt (1 zu 200 verdünnt) für 20 Minuten bei RT und Dunkelheit inkubiert, bevor sie nach erneutem dreimaligem Waschschrift mit 50 µl Reaktionslösung (zu gleichen Teilen H₂O₂ und Tetramethylbenzidin) inkubiert wurden. Die Platte wurde so lange bei RT im

Dunkeln belassen, bis eine deutliche Blaufärbung in der dritthöchsten Standardverdünnung zu sehen war, daraufhin erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 50 µl von 1 M H₂SO₄ Lösung. Abschließend erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte jedes wells bei 450 nm mit dem Mithras LB940 ELISA Reader.

Höchste Standardkonzentration für verwendete ELISAs:

murines CCL17	2000 pg/ml
murines CCL22	500 pg/ml
humanes CCL22	500 pg/ml
humanes CCL17	500 pg/ml
murines IL2	200 pg/ml

4.4 Durchflusszytometrie

4.4.1 allgemeines Funktionsprinzip

Mittels der Durchflusszytometrie, auch *Fluorescent-activated cell sorting* (FACS) genannt, lassen sich einzelne Zellen durch Wechselwirkung von Laserlicht mit fluoreszierenden Molekülen, die an Antikörper gekoppelt sind, analysieren und aufreinigen. Hierbei wird jede Zelle einzeln nacheinander mit verschiedenen Lasern bestrahlt und das gestreute und emittierte Licht untersucht. Durch die serielle Bestrahlung mit verschiedenen Laserspektren und individuell konfigurierbare Wellenlängenfilter bei der Analyse des emittierten Lichtes können gleichzeitig mehrere Fluorochrome verwendet werden. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörper können sowohl an extrazelluläre als auch an intrazelluläre Antigene gebunden sein.

4.4.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für die Analyse von Oberflächenmolekülen wurden Zellen in PBS mit 10 µl/ml Antikörperlösung bei 4° C in Dunkelheit für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PBS mit 2% FCS zur FACS-Analyse resuspendiert.

4.4.3 Bestimmung von intrazellulären Molekülen

Für die Analyse von intrazellulären Molekülen wurde das Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set von eBioscience verwendet. Nachdem die Oberflächenmoleküle gefärbt wurden (siehe 4.4.2), wurden die Zellen abzentrifugiert (400 G, 4° C, 5 Minuten) und in Fixations- / Permeabilisierungsreagenz gelöst. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4° C wurden die Zellen zweimal in Permeabilisierungspuffer gewaschen und in 50 µl dieses Puffers resuspendiert. Es wurden 10 µl/ml eines Antikörpers gegen das Zielmolekül hinzugegeben und nach 30 Minuten Inkubation bei 4° C und Dunkelheit zweimal in Permeabilisierungspuffer gewaschen. Die Zellen wurden in PBS mit 2% FCS resuspendiert und am FACS-Gerät analysiert.

4.5 Vakzinierung von Mäusen mit dendritischen Zellen

4.5.1 Stimulation und Beladung von dendritischen Zellen mit OVA₂₅₇₋₂₆₄

10 Millionen BMDCs wurden in 10 ml BMDC Medium für 1 Stunde mit Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄ (OVA) (100 nM) kultiviert. Anschließend wurden 6 µg/ml CpG 1826 hinzu gegeben und die Zellen für weitere 4 Stunden in Kultur gelassen. Vor Weiterverwendung der Zellen erfolgte ein Waschschrift in PBS (400 G, 4° C, 7 Minuten).

4.5.2 Vakzinierung der Mäuse

Den Mäusen wurden 400.000 BMDCs in 100 µl PBS mit 10 µg CpG und 2 mg Inject Alum intraperitoneal injiziert. Die Vakzinierung wurde im Abstand von einer Woche dreimal wiederholt, bevor nach einer Woche peripheres Blut gewonnen wurde, um den Vakzinierungserfolg zu überprüfen und nach einer weiteren Woche der Versuch beendet wurde.

4.6 Interferon-γ Restimulationsassay

4 Millionen Zellen wurden in 100 µl mit 5 µg /ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert, bevor 1 µg/ml Brefeldin A hinzugegeben wurde und die Zellen für weitere 3 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Die Zellen wurden in PBS gewaschen

(400 G, 4° C, 7 Minuten) und für 20 Minuten bei 4° C mit anti-CD8 APC-Cy-7 Antikörper inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS (600 G, 4° C, 7 Minuten) fand eine intrazelluläre FACS Färbung (siehe 4.4.3, Seite 33) mittels anti-IFN- γ *pacific blue* Antikörper statt. Ionomycin (500 ng/ml) in Kombination mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (50 ng/ml) wurde als Positivkontrolle für die Stimulation verwendet.

4.7 *In vitro* Kontaktanalyse

4.7.1 Etablierung des dreidimensionalen Kontakt- und Migrationsassays

Die Grundidee hinter der Etablierung dieser neuen Methode war, die Attraktion und Interaktion von Zellen unter möglichst physiologischen Bedingungen im dreidimensionalen Raum untersuchen zu wollen. Der erste Schritt bestand darin, eine Methode zu entwickeln, die Zellen in das Kollagengel einzubringen. Es wurden Versuche gemacht, in denen die Zellen mittels Spritze in das Gel injiziert wurden, auf die Gelmatrix gegeben wurden, sodass sie in das Gel einwandern konnten oder sich schon während dem Polymerisierungsprozesses in der Gelmatrix befanden. Letztere Methode hat sich als am geeignetsten herausgestellt, da dadurch eine homogene Verteilung der Zellen im Gel erreicht werden konnte.

Anschließend sollte die am besten geeignete Kollagenkonzentration für das Gel gefunden werden. Hierzu wurden Experimente mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt bei denen die Geschwindigkeit sowie die Anzahl der sich bewegenden Zellen untersucht wurden (siehe Abbildung 2, Seite 35). Bei weniger als 0,5 mg/ml Kollagen ergab sich eine zu instabile und inhomogene Gelmatrix, sodass Hohlräume entstanden und eine beträchtliche Zahl an Zellen auf den Boden sackten. Es zeigte sich, dass die Anzahl der migrierenden Zellen umso größer war, je geringer die Kollagenkonzentration war. Für die maximale Geschwindigkeit ergab sich mit Ausnahme von 1,7 mg/ml Kollagen ein Wert um die 5 μ m/Minute und bei der Durchschnittsgeschwindigkeit zeichnete sich eine Abnahme mit zunehmender Kollagenkonzentration ab.

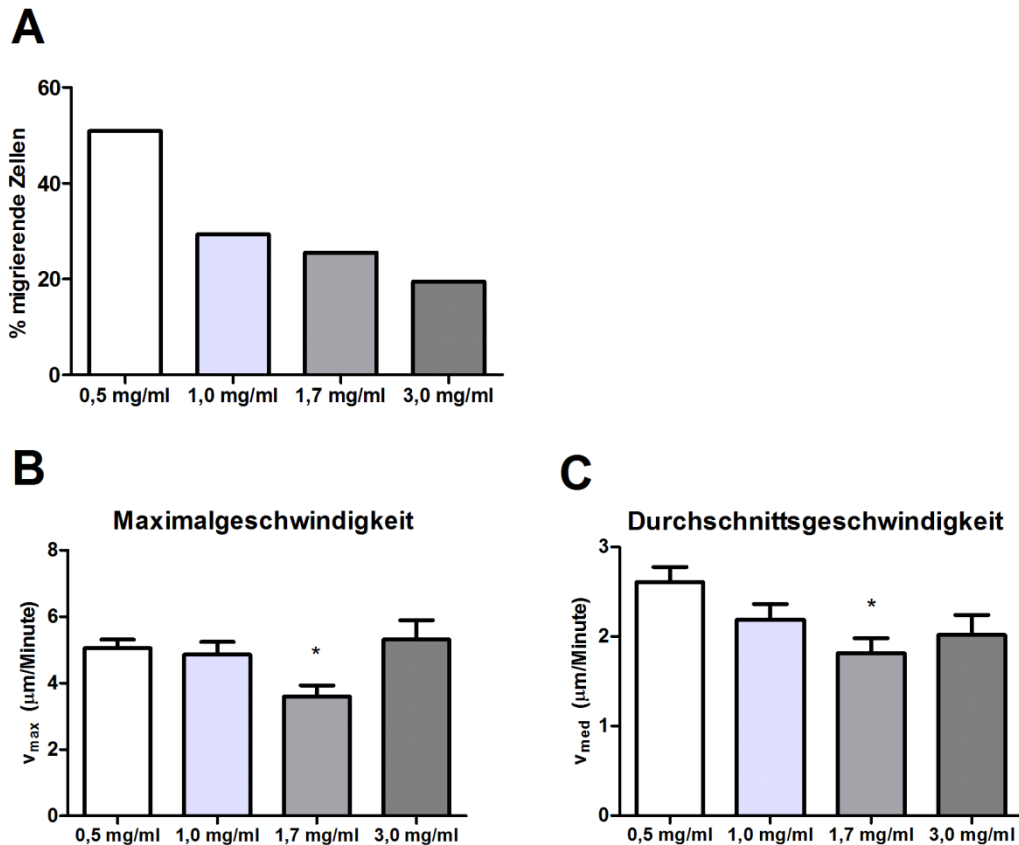


Abbildung 2: Vergleich verschiedener Kollagenkonzentrationen hinsichtlich der Geschwindigkeit und Anzahl der Zellen in Bewegung

Mit PKH 26 gefärbte Splenozyten wurden in verschiedene Konzentrationen von Kollagen eingebettet und über drei Stunden mittels konfokaler Lasermikroskopie gefilmt. Die dreidimensionalen Datensätze wurden mit Bitplane Imaris Software auf (A) die Anzahl der sich bewegenden Zellen, (B) die Maximalgeschwindigkeit und (C) die Durchschnittsgeschwindigkeit hin ausgewertet. In (B) und (C) wurden die abgebildeten Durchschnittswerte aus 115 (0,5mg/ml), 52 (1,0 mg/ml), 27 (1,7mg/ml), bzw. 32 (3,0 mg/ml) Einzelwerten gebildet. Der Fehlerbalken repräsentiert den SEM der Mittelwerte. * = $p < 0.05$ im Vergleich zu 0,5 mg/ml, kein * = keine Signifikanz

Um eine möglichst gute Auswertbarkeit der Videos zu erreichen, wurden 1 Million T-Zellen je Kammer eingesetzt. Dies entspricht nicht der Zelldichte *in vivo* im Lymphknoten, ergibt aber Videos, in denen morphologisch noch gut zwischen den einzelnen T-Zellen unterschieden werden kann (Dzhagalov et al. 2012).

Zur Färbung der Zellen wurden die Membranfarbstoffe PKH 67 (grün) und PKH 26 (rot) der Firma Sigma-Aldrich verwendet, da sie mit dem konfokalen Lasermikroskop differenziert werden konnten und die Zellen gut anfärbten. Zur weiteren Analyse wurde in Kooperation mit dem Bildanalyse-Unternehmen Wimasis Image Analysis ein automatisiert arbeitender Algorithmus zur Erkennung grün gefärbter DCs, rot gefärbter T-Zellen und von Zell-Zell-Kontakten entwickelt. Wie sich herausstellte, neigten DCs dazu, über die Zeit hinweg den jeweils anderen Farbstoff aufzunehmen. Um dadurch

keine falschen Kontakte wahrzunehmen, wurde der Algorithmus entsprechend programmiert, die in den DCs entstehenden roten Flächen nicht fälschlicher Weise als T-Zelle zu erkennen.

In der Anfangszeit des Projektes wurden die Aufnahmen am konfokalen Lasermikroskop mit einer Auflösung von 1024×1024 , einer Abtastrate von 400 Hz und einem Zoomfaktor von 1,0 durchgeführt. Im Laufe des Projektes stellte sich heraus, dass auch mit einer geringeren Auflösung suffizient auswertbare Videos erstellt werden konnten, wodurch durch die Zeiteinsparung beim Aufnahmeprozess zwölf statt wie bisher nur 4 Positionen gleichzeitig gefilmt werden konnten. Hierdurch war es möglich, die dreifache Menge an Zellen gleichzeitig zu analysieren. Darauf folgend wurden alle weiteren Experimente mit der niedrigauflösenden Methode gemacht. Diese hatte eine Auflösung von 256×256 , eine Abtastrate von 700 Hz und einen Zoomfaktor von 1,7.

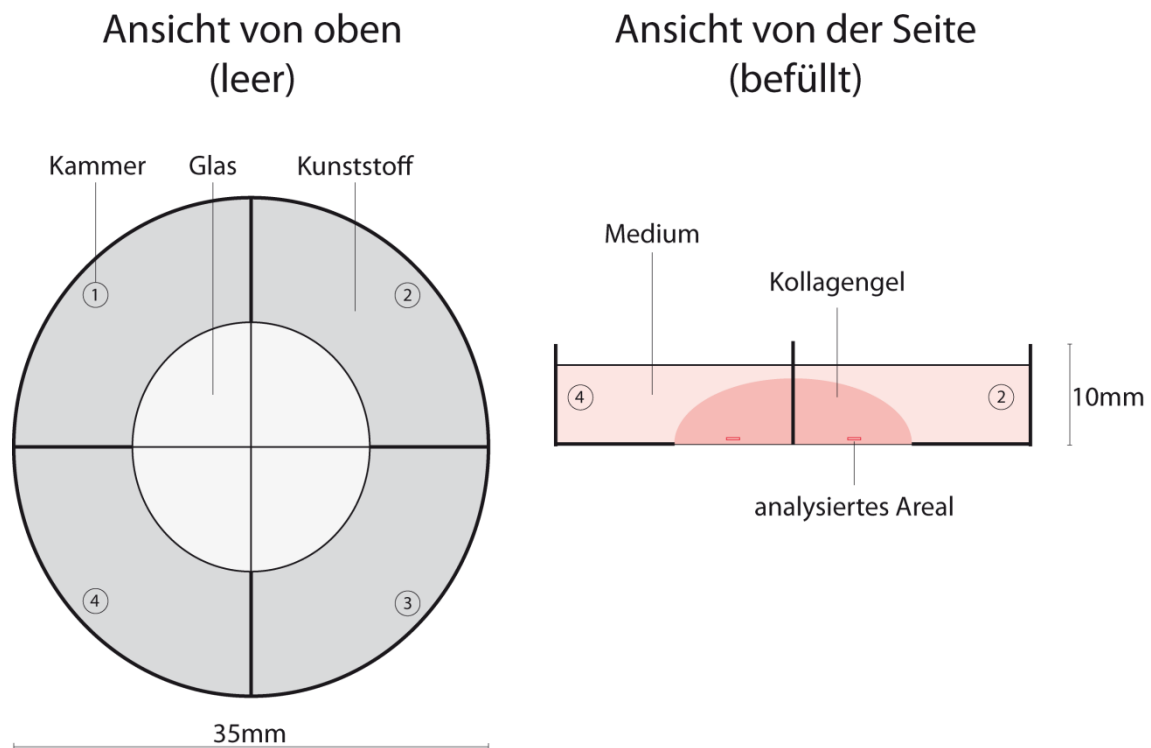


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Auf der linken Seite ist der Versuchsaufbau schematisch in leerem Zustand und von oben und auf der rechten Seite in gefülltem Zustand von der Seite abgebildet. Das System besteht aus vier voneinander getrennten Kammern.

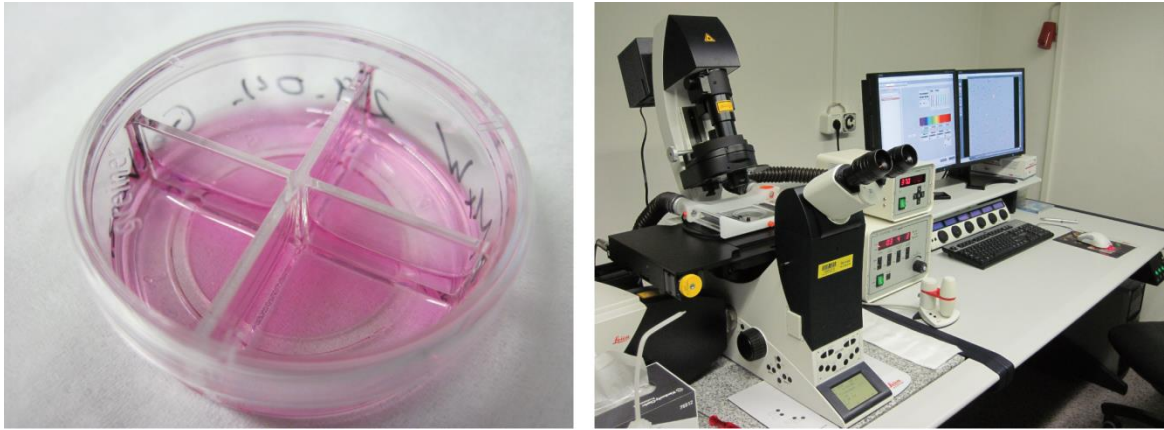


Abbildung 4: Foto der befüllten Gelkammer (links) und des startbereiten gesamten Versuchsaufbaus
 In dem Foto auf der rechten Seite sind (von links nach rechts) das konfokale Mikroskop (Leica TCS SP5), die Kontrollpanel für die CO₂-Begasung und Temperaturregulierung und der Computer zur Steuerung des Mikroskops zu sehen.

4.7.2 Versuchsaufbau

Zunächst wurde ein Kollagenmastermix hergestellt, der in einer 1 zu 5 Verdünnung die gewollte Konzentration von Kollagen ergab. Für eine Kollagenendkonzentration von 0,5 mg/ml wurden 10 µl *Minimal essential medium* (MEM) mit 36 µl autoklaviertem destilliertem Wasser, 2,93 µl 7,5% Bikarbonatlösung, 1,25 µl 3M Natronlauge und 50 µl Kollagenmonomerkonzentrat auf Eis in der aufgeführten Reihenfolge vorsichtig vermischt. Von der erhaltenen Lösung wurden auf Eis 20 µl zu 80 µl Zellsuspension gegeben, vorsichtig vermischt und in eine der vier Kammern einer Glasboden-Petrischale pipettiert (siehe Abbildung 3 und linke Seite Abbildung 4). In 80 µl Zellsuspension befanden sich 0,1 Mio mit PKH 67 gefärbte DCs und 1 Mio mit PKH 26 gefärbte T-Zellen. Nach 45 Minuten Inkubation bei 37°C war das Gel polymerisiert und es wurden 500 µl T-Zell-Medium als Verdunstungspuffer in jede Kammer über das Gel gegeben. Rekombinantes IL-2 wurde in entsprechender Menge sowohl zur Zellsuspension als auch in den Überstand gegeben, sodass in allen Kompartimenten des Versuchs eine einheitliche IL-2 Konzentration von 10 Units/ml herrschte.

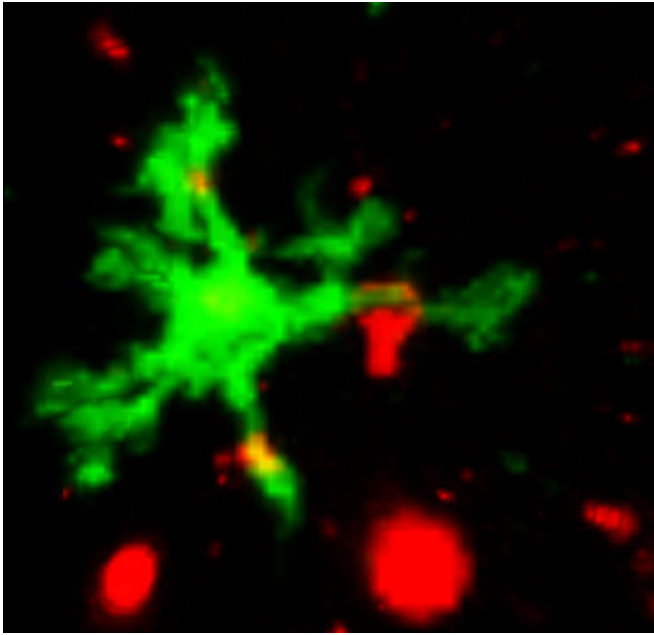


Abbildung 5: Videoausschnitt mit grün gefärbter BMDC und rot gefärbten T_{reg}-Zellen

Grün (PKH67) gefärbte BMDCs und rot (PKH26) gefärbte T_{reg}-Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO₂-haltiger Luft mehrere Stunden kokultiviert. Der Kantenlänge des abgebildeten Bildausschnittes entsprechen etwa 100 µm.

Am konfokalen Mikroskop wurde die Glasboden-Petrischale mit 5% CO₂-haltiger Luft begast und auf konstant 37°C beheizt (siehe Abbildung 4). Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop von Leika mit einem 20x Objektiv vorgenommen. Die Farbstoffe PKH 67 und PKH 26 wurden mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm, respektive 514 nm angeregt und das emittierte Licht wurde mit einem Prismenfilter von 500 bis 540 nm, respektive 600 bis 700 nm detektiert. In jeder der 4 Kammern der Glasboden-Petrischale wurde eine Position markiert, an der 30 µm über dem Glasboden ein 100 µm hoher und 600 µm breiter Quader der Kollagenmatrix durch 21 Einzelbilder, je im vertikalen Abstand von 5 µm, etwa alle 2 Minuten aufgenommen wurde. Am Computer konnte daraus ein dreidimensionaler Film der gefärbten Zellen in dem jeweiligen Ausschnitt aus der Kollagenmatrix erzeugt werden. Die Aufnahmedauer belief sich auf etwa 15 Stunden. Für die weitere Auswertung wurden die ersten 200 Frames verwendet, was den ersten 8 Stunden und 20 Minuten des Versuchs entspricht, da die Vitalität der Zellen in der zweiten Hälfte des Videos zunehmend schlechter wurde.

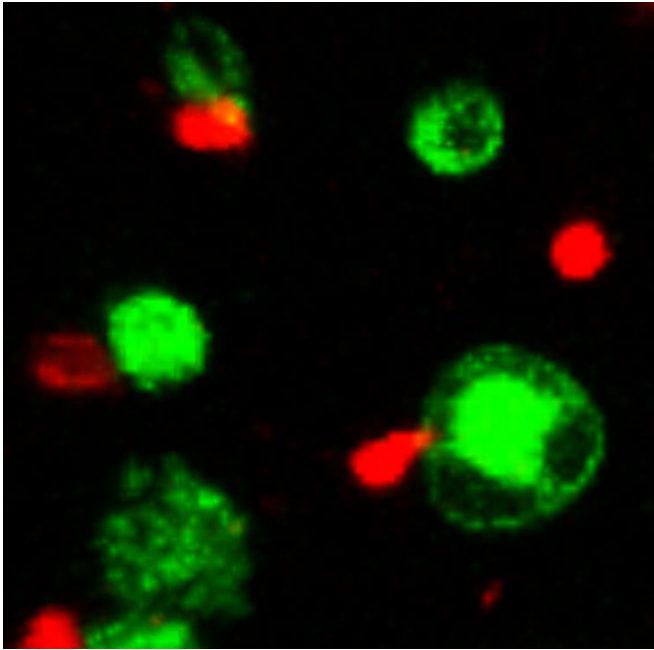


Abbildung 6: Videoausschnitt mit grün gefärbten DC2.4 und rot gefärbten T_{reg}-Zellen

Grün (PKH67) gefärbte DC2.4 und rot (PKH26) gefärbte T_{reg}-Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO₂-haltiger Luft mehrere Stunden kokultiviert. Der Kantenlänge des abgebildeten Bildausschnittes entsprechen etwa 100 µm.

4.7.3 Auswertung

Der Film wurde für die Auswertung in ein zweidimensionales Video konvertiert und anschließend von dem automatisierten Algorithmus analysiert. Das Ergebnis der Analyse wurde in einer Tabelle ausgegeben. Für jeden Frame des Videos wurden jeweils die Gesamtzahl an DCs und T-Zellen sowie jeweils die Zahl der Zellen die sich mit einer der anderen Zellpopulation in Kontakt befand berechnet. Jede Videoanalyse wurde von Hand auf mögliche falsch erkannte Zellen überprüft. Als nächsten Schritt wurde für jeden Frame die durchschnittliche Prozentzahl an DCs, die in Kontakt mit T-Zellen steht berechnet.

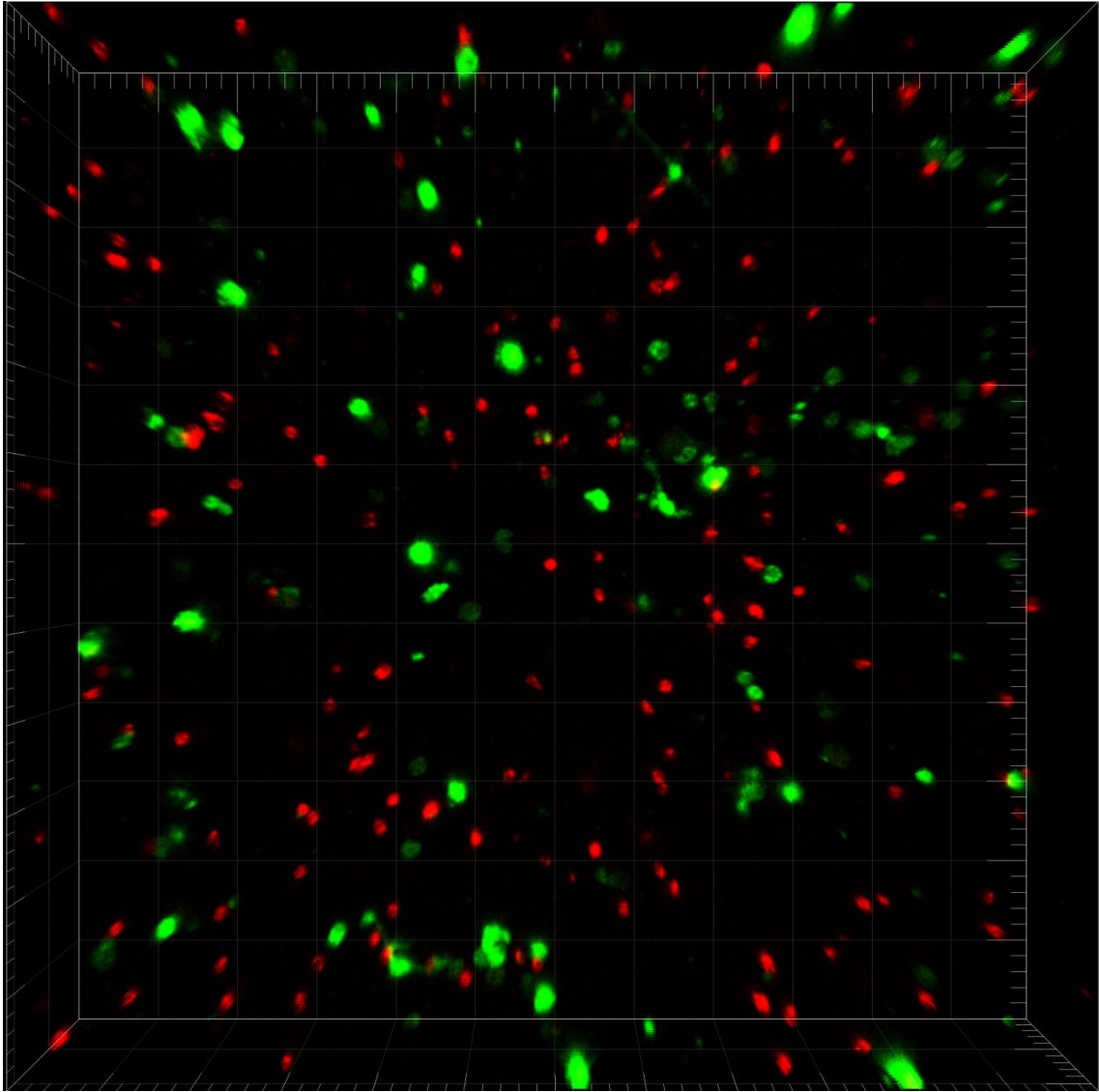


Abbildung 7: Gesamtansicht eines Videos mit grün gefärbten BMDC und rot gefärbten T_{reg}-Zellen

Grün (PKH67) gefärbte BMDCs und rot (PKH26) gefärbte T_{reg}-Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO₂-haltiger Luft mehrere Stunden kokultiviert. Der abgebildeten Rasterung entsprechen etwa 50 µm, die Gesamtbreite des Bildes beträgt 600 µm.

Trotz gleicher Ausgangszellzahlen für jede Kondition gab es teilweise Unterschiede in der Gesamtzellzahl der T-Zellen je Video. Da man bei einer höheren Gesamtzahl an T-Zellen häufiger zufällige Zellüberlappungen und -kontakte erwarten kann und dies zu einer statistischen Verzerrung führen würde, wurden die resultierenden Prozent-Werte der DCs auf eine durchschnittliche T-Zell-Zahl normiert. Hierfür wurde folgender Maßes vorgegangen:

$$\%DCs(normiert) = \%DCs \times \frac{n_{T-Zellen}(Durchschnitt)}{n_{T-Zellen}(Frame)}$$

Formel 1: Berechnung der normierten Prozentanzahl der DCs die in Kontakt mit T-Zellen stehen

%DCs = Prozent der DCs, die im jeweiligen Frame mit T-Zellen in Kontakt stehen; $n_{T-Zellen}(Durchschnitt)$ = durchschnittliche Anzahl der T-Zellen, gemittelt aus allen Konditionen des Versuches; $n_{T-Zellen}(Frame)$ = Anzahl der T-Zellen im jeweiligen Frame des betrachteten Videos

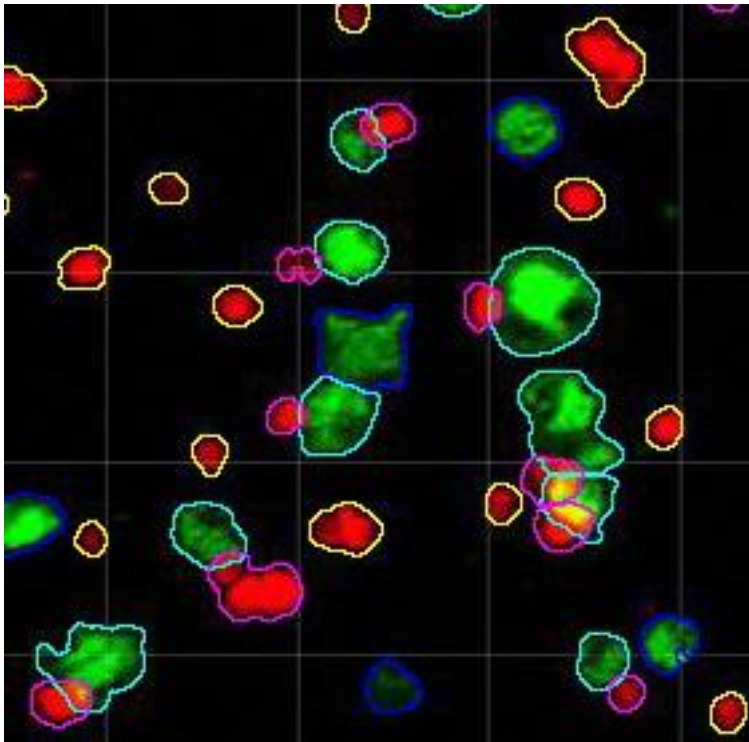


Abbildung 8: Ausschnitt aus einem Videoframe nach Auswertung mit dem automatisierten Algorithmus

Grün (PKH67) gefärbte DC2.4 und rot (PKH26) gefärbte T_{reg}-Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO₂-haltiger Luft gefilmt. Dies ist ein repräsentativer Frame nach Analyse mit dem automatisierten Algorithmus. Die Umrandungen haben folgende Bedeutung: blau = DC ohne Kontakt; türkis = DC in Kontakt; gelb = T-Zelle ohne Kontakt; rosa = T-Zelle mit Kontakt. Der abgebildeten Rasterung entsprechen 50µm.

4.8 Statistische Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse durch ihr arithmetisches Mittel, ihren Standardfehler des Mittelwertes (*Standard error of the mean* = SEM) und bei Verwendung der Punktwolken-Diagramme zusätzlich durch alle Einzelwerte angegeben. Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden anhand des zweiseitigen Student-t-Tests für unverbundene Stichproben berechnet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit GraphPad Prism vorgenommen und Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 CCL22 Produktion dendritischer Zellen führt selektiv zu mehr Kontakten mit regulatorischen T-Zellen

DCs befinden sich innerhalb des Immunsystems an einer Schlüsselposition, an der entschieden wird, ob auf ein bestimmtes Antigen eine Aktivierung des Immunsystems im Sinne einer Immunantwort, oder eine immunsuppressive Reaktion hervorgerufen wird. Eine der wichtigsten Komponenten dieser Entscheidungsfindung ist die immunsuppressiv wirkende T_{reg}-Zelle.

Das direkte "In-Kontakt-Treten" von T_{reg}-Zellen mit DCs ist essentiell für ihre suppressive Funktion, da ihr potentester Suppressionsmechanismus, nämlich die Interaktion von CTLA4 mit CD80 und CD86 auf DCs, dies voraussetzt (Tang et al. 2006, Onishi et al. 2008, Wing et al. 2008, Sakaguchi et al. 2009, Sakaguchi et al. 2010, Wing and Sakaguchi 2010). Der Mechanismus, der zu dieser Kontaktformation führt, ist noch nicht bekannt und sollte möglichst spezifisch für T_{reg}-Zellen sein, da sie eine völlig andere Funktion haben als die T-Effektor-Zellen (T_{eff}-Zellen), welche die übrigen T_h-Zellen darstellen, die auf ein passendes Antigen immunstimulierend wirken können.

Nach TLR-Stimulation von DCs zeigt sich in ihrem Chemokinexpressionsprofil eine deutliche Hochregulation von CCL22 und CCL17 (Lieberman and Forster 1999, Sallusto et al. 1999). Der Rezeptor dieser beiden Chemokine ist CCR4 und ist unter homöostatischen Bedingungen selektiv auf T_{reg}-Zellen exprimiert (Iellem et al. 2001). Im Rahmen der nachfolgenden Versuche wurde untersucht, ob von DCs sezerniertes CCL22 zu mehr Kontakten mit T_{reg}-Zellen führt und ob dieser Effekt spezifisch im Vergleich mit T_{eff}-Zellen ist.

5.1.1 DC-T_{reg}-Zell-Kontakte sind unter CCL22 Überexpression durch DCs vermehrt

Hierfür wurde die immortalisierte, mit einem lentiviralen CCL22-Tet-On Konstrukt transfizierte Zelllinie DC2.4 mit T_{reg}-Zellen oder T_{eff}-Zellen in einem dreidimensionalen Kontakt- und Migrationsassay kokultiviert.

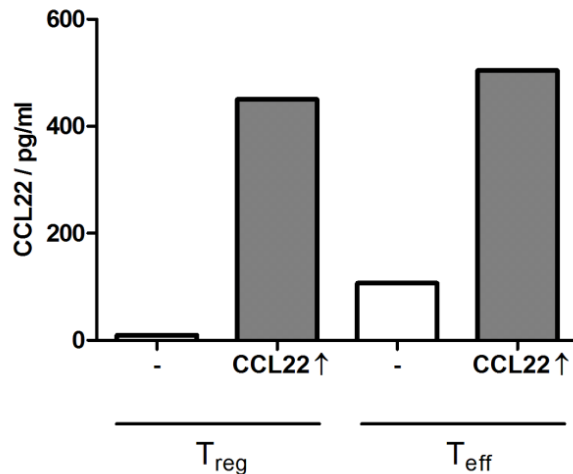


Abbildung 9: CCL22 ELISA aus DC2.4 Überstand

CCL22 Konzentration wurde aus dem Überstand der Kokultur mit T_{reg}- (links) und T_{eff}-Zellen (rechts) jeweils ohne und mit Doxycyclin-Zugabe und damit CCL22 Überexpression bestimmt.

Die T_{reg}-Zellen wurden aus Splenozyten durch MACS mit den Kriterien CD4⁺ und CD25⁺ und die T_{eff}-Zellen mit den Kriterien CD4⁺ und CD25⁻ gewonnen. Die DC2.4 Zellen wurden vor dem Versuch entweder über 12 Stunden mit 2 µg/ml Doxycyclin inkubiert oder waren unbehandelt. DC2.4 Zellen können ohne Doxycyclin-Zugabe kein CCL22 produzieren. Die DCs und T-Zellen wurden unterschiedlich gefärbt, im Verhältnis 1 zu 10 in ein Kollagengel eingebettet und es wurde ein dreidimensionaler Kontakt- und Migrationsassay durchgeführt. Aus den Überständen wurde CCL22 mittels ELISA bestimmt (siehe Abbildung 9) und die Videos wurden durch einen automatisiert arbeitenden Algorithmus auf Kontaktformation hin ausgewertet.

Die CCL22 Konzentration war in den Konditionen mit CCL22 Überexpression erwartungsgemäß erhöht, während in der Kondition ohne Überexpression mit T_{reg}-Zellen so gut wie kein CCL22 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 9). T_{eff}-Zellen können geringe Mengen CCL22 produzieren (siehe Einleitung unter 1.4.2 Die Chemokine CCL22 und CCL17), weshalb in den Versuchsansätzen, die T_{eff}-Zellen enthalten, auch in der Kondition ohne Doxycyclin-Zugabe CCL22 nachweisbar ist.

Bemerkenswert war, dass sich für DCs mit CCL22 Überexpression eine signifikante Zunahme der Kontaktrate mit T_{reg}-Zellen zeigte, während mit T_{eff}-Zellen kein Unterschied zur Kontrollkondition festzustellen war (Abbildung 10). Somit ist anzunehmen, dass die Sekretion von CCL22 in DCs spezifisch die Kontaktformation mit T_{reg}-Zellen vermittelt.

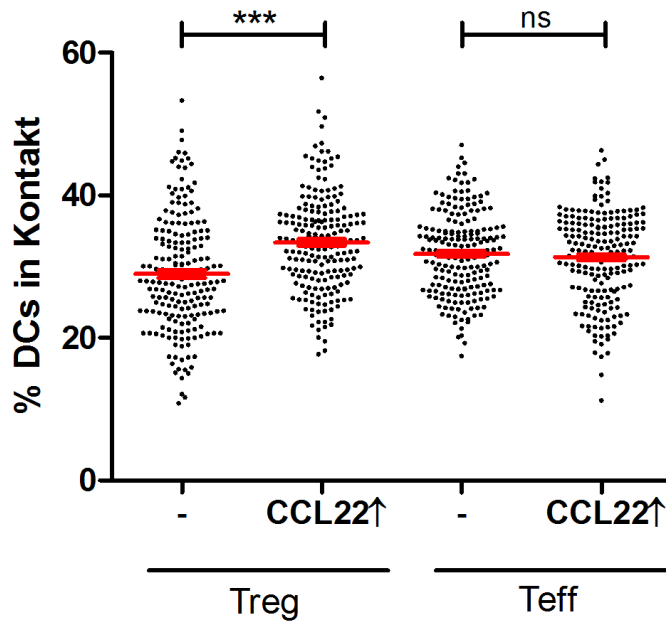


Abbildung 10: CCL22 überexprimierende DC2.4 mit T_{reg}- und T_{eff}-Zellen

10⁵ mit PKH67 (grün) gefärbte, mit CCL22-Tet-On Konstrukt stabil transfizierte DC2.4 und 10⁶ mit PKH26 (rot) gefärbte T_{reg}-, bzw. T_{eff}-Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO₂-haltiger Luft über 8 Stunden gefilmt. Zur CCL22-Überexpression wurden die DC2.4 für 12 Stunden mit 2 µg/ml Doxycyclin vorbehandelt. Die Videos wurden mit einem automatisierten Algorithmus ausgewertet. Dargestellt sind die Prozent der DCs, die mit T-Zellen in Kontakt stehen für Kokultur mit T_{reg}- (links) und T_{eff}-Zellen (rechts) jeweils ohne und mit CCL22 Überexpression. Ein Punkt entspricht einem Frame eines Videos; ein Video je Kondition; Fehlerbalken = SEM; p ***<0,001; ns = nicht signifikant; dieser Versuch wurde fünf Mal durchgeführt (davon zweimal im direkten Vergleich mit T_{eff}-Zellen)

5.1.2 DC-T_{reg}-Zell-Kontakte sind unter selektivem CCL22 Knockout in DCs verringert

Die Überexpression von CCL22 in DC führt zu vermehrten Kontakten mit T_{reg}-Zellen. Aufbauend auf diesem Befund sollte nun die Hypothese, dass durch einen selektiven Knockout von CCL22 in DCs die Kontakte mit T_{reg}-Zellen *reduziert* werden, überprüft werden. Hierfür wurden DCs aus Knochenmark von Mäusen mit CCL22-Knockout und von Wildtyp (WT) Mäusen generiert und mit WT T_{reg}-Zellen oder WT T_{eff}-Zellen im dreidimensionalen Kontakt- und Migrationsassay kokultiviert.

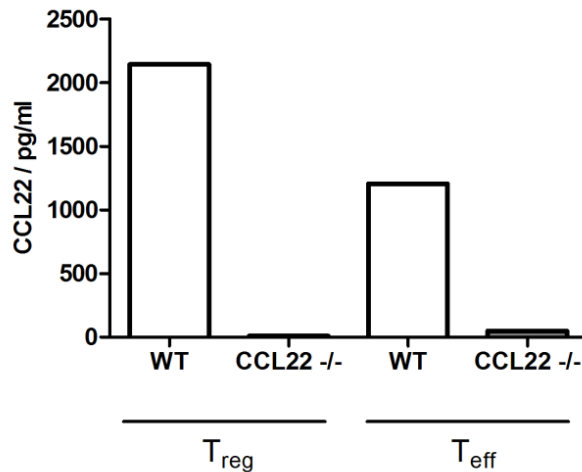


Abbildung 11: CCL22 ELISA aus Überstand von Versuch mit DCs mit CCL22 Knockout

CCL22 Konzentration wurde aus dem Überstand der Kokultur mit T_{reg} - (links) und T_{eff} -Zellen (rechts) jeweils mit WT oder mit CCL22 Knockout DCs bestimmt.

Aus den Überständen wurde CCL22 mittels ELISA bestimmt und die Videos wurden durch einen automatisiert arbeitenden Algorithmus auf Kontaktformation hin ausgewertet.

Die Konditionen mit CCL22 Knockout DCs zeigten tatsächlich so gut wie keine (im Fall von Ko-Kultivierung mit T_{reg} -Zellen) beziehungsweise nur sehr geringe (im Fall von Ko-Kultivierung mit T_{eff} -Zellen) CCL22 Konzentrationen. Letzteres kann, wie schon unter 5.1.1 angesprochen durch die T_{eff} -Zellen selbst erklärt werden.

Für die nicht zur CCL22 Produktion fähigen DCs zeigte sich eine signifikante Abnahme der Kontaktrate mit T_{reg} -Zellen. In der Ko-Kultur mit T_{eff} -Zellen war kein Unterschied zur WT Kondition festzustellen (Abbildung 12). Nachdem gezeigt werden konnte, dass es unter Doxycyclin-induzierter CCL22 Überexpression zur vermehrten Kontakt-Frequenz von DCs mit T_{reg} -Zellen kommt (siehe 5.1.1), wird hier nun gezeigt, dass es durch mittels CCL22-Knockout ausgeschaltener CCL22 Produktion durch DCs zu einer Verringerung der Kontakt-Frequenz mit T_{reg} -Zellen kommt. Beide Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Kontaktvermittlung zwischen DCs und T_{reg} -Zellen über von DCs sezerniertes CCL22 vermittelt wird.

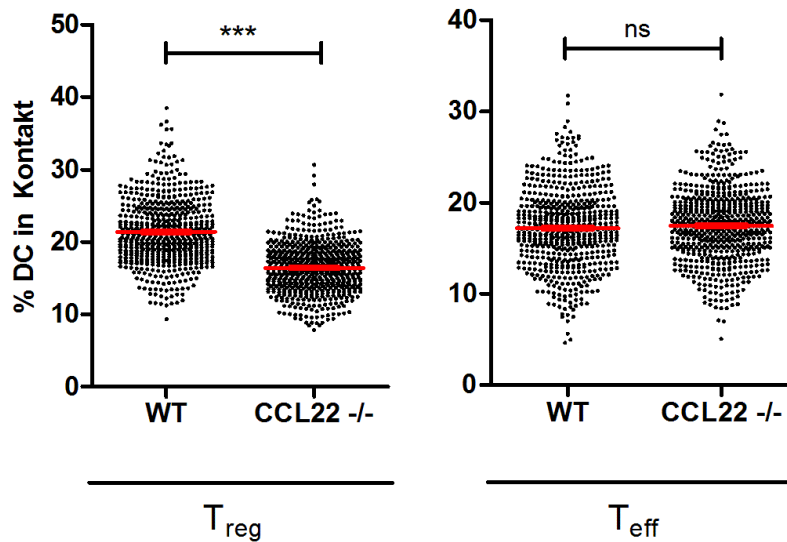


Abbildung 12: DCs mit CCL22-Knockout mit T_{reg} - und T_{eff} -Zellen

10^5 mit PKH67 (grün) gefärbte BMDCs und 10^6 mit PKH26 (rot) gefärbte T_{reg} -, bzw. T_{eff} -Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO₂-haltiger Luft über 8 Stunden gefilmt. BMDCs wurden entweder aus Knochenmark von WT oder von CCL22 -/- Mäusen generiert. Siehe für ergänzende Informationen zur Auswertung und Darstellung Legende Abbildung 10; drei Videos je Kondition; dieser Versuch wurde zwei Mal durchgeführt

5.1.3 DC- T_{reg} -Zell-Kontakte sind unter CCL22 Knockdown in DCs verringert

Um den Beitrag von CCL22 zur DC- T_{reg} Kontaktbildung weiter zu validieren, wurde ein Versuch mit DCs mit CCL22-Knockdown durch RNA-Interferenz durchgeführt. Hierfür wurden DCs aus Knochenmark von WT Mäusen generiert und einer RNA-Interferenz durch Elektroporation unterzogen. Durch die Transfektion zeigte sich eine deutliche Suppression der CCL22 Produktion im Vergleich zur Kontroll-siRNA (siehe Abbildung 13).

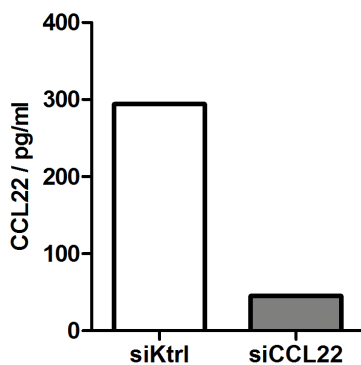


Abbildung 13: CCL22 ELISA aus Überstand von Versuch mit DCs mit CCL22-RNA-Interferenz

CCL22 Konzentration wurde aus dem Überstand der Kokultur von T_{reg}-Zellen mit DCs mit Kontroll-siRNA (links) oder mit gegen CCL22-mRNA gerichtete siRNA (rechts) bestimmt.

Die vorhergehenden Versuche bestätigend zeigte sich für die DCs mit eingeschränkter Fähigkeit zur CCL22-Produktion eine Abnahme der Kontaktrate mit T_{reg}-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 14). Auch dieses Experiment unterstreicht die Bedeutung von CCL22 für die Kontaktbildung von DCs mit T_{reg}-Zellen.

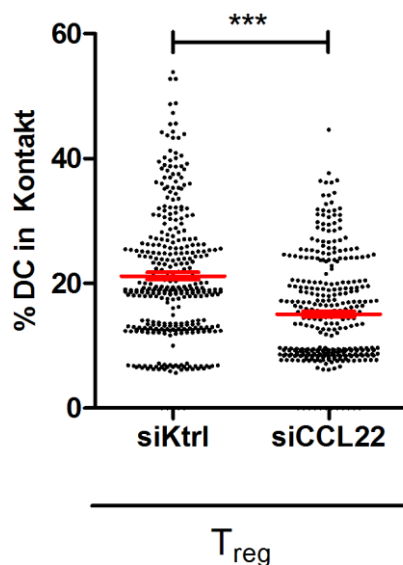


Abbildung 14: DCs mit RNA-Interferenz Knockdown von CCL22 mit T_{reg}-Zellen

10⁵ mit PKH67 (grün) gefärbte BMDCs und 10⁶ mit PKH26 (rot) gefärbte T_{reg}-Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO₂-haltiger Luft über 8 Stunden gefilmt. BMDCs wurden aus Knochenmark von WT Mäusen generiert und einer RNA-Interferenz entweder mit Kontroll-siRNA (siKtrl) oder siRNA gegen CCL22-mRNA (siCCL22) unterzogen. Siehe für ergänzende Informationen zur Auswertung und Darstellung Legende Abbildung 10; ein Video je Kondition; dieser Versuch wurde vier Mal durchgeführt

5.2 CCL17 Produktion dendritischer Zellen führt selektiv zu mehr Kontakten mit regulatorischen T-Zellen

Wie unter 5.1 (Seite 42) ausgeführt, ist die Kontaktformation mit DCs für die Funktion von T_{reg}-Zellen essentiell. Analog zu CCL22 wird allerdings auch CCL17 nach TLR-Stimulation von DCs vermehrt exprimiert und der Rezeptor beider Chemokine, CCR4 ist unter homöostatischen Bedingungen selektiv auf T_{reg}-Zellen exprimiert.

Im Rahmen der nachfolgenden Versuche soll untersucht werden, ob von DCs sezerniertes CCL17 zu mehr Kontakten mit T_{reg} -Zellen führt und ob dieser Effekt spezifisch im Vergleich mit T_{eff} -Zellen ist.

5.2.1 DC- T_{reg} -Zell-Kontakte sind unter CCL17 Überexpression durch DCs vermehrt

In diesem Experiment wurde diese Hypothese mit DCs, welche CCL17 Doxycyclin-induziert überexprimieren können, geprüft. Hierfür wurde die immortalisierte, mit einem lentiviralen CCL17-Tet-On Konstrukt transfizierte Zelllinie DC2.4 mit T_{reg} -Zellen oder T_{eff} -Zellen in einem dreidimensionalen Kontakt- und Migrationsassay kokultiviert. Der Versuchsaufbau entspricht dem unter 5.1.1, Seite 42 beschriebenem.

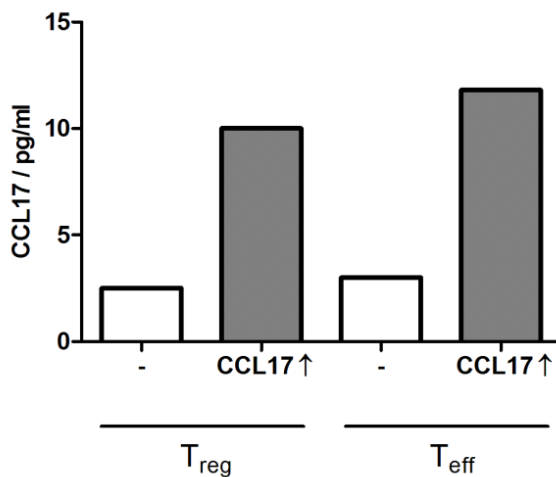


Abbildung 15: CCL17 ELISA aus Überstand von DC2.4 Zellen mit CCL17 Überexpression

Die CCL17 Konzentration wurde aus dem Überstand der Kokultur mit T_{reg} - (links) und T_{eff} -Zellen (rechts) jeweils ohne und mit Doxycyclin-Zugabe und damit CCL22 Überexpression bestimmt.

In den Konditionen mit Überexpression war CCL17 höher als in den Konditionen ohne Doxycyclin Vorinkubation (Abbildung 15), gleichwohl war die Stärke der Überexpression im Vergleich zu CCL22 geringer ausgeprägt.

Für DCs mit CCL17 Überexpression zeigte sich eine deutliche Zunahme der Kontaktrate mit T_{reg} -Zellen, während das für T_{eff} -Zellen nicht der Fall war (Abbildung 16). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch CCL17 eine entscheidende Rolle für die Kontaktformation von T_{reg} -Zellen und DCs spielt.

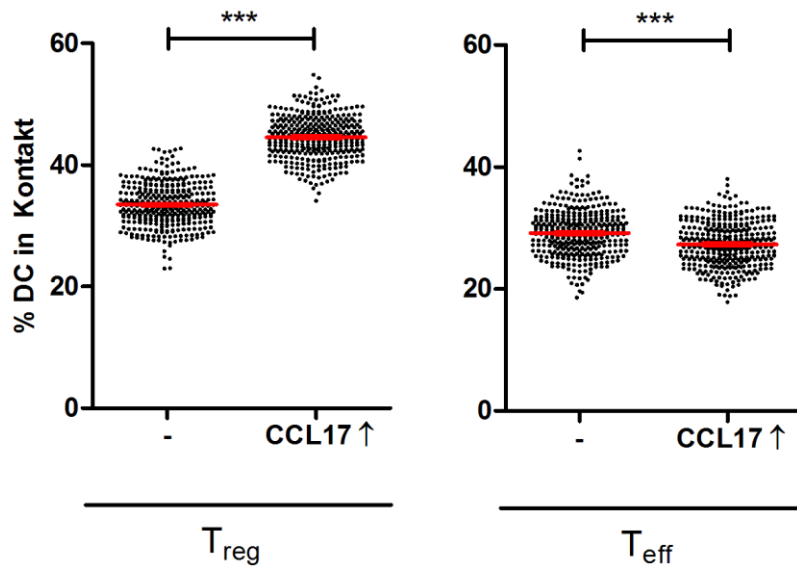


Abbildung 16: CCL17 überexprimierende DC2.4 mit T_{reg}- und T_{eff}-Zellen

10⁵ mit PKH67 (grün) gefärbte, mit CCL17-Tet-On Konstrukt stabil transfizierte DC2.4 und 10⁶ mit PKH26 (rot) gefärbte T_{reg}-, bzw. T_{eff}-Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO₂-haltiger Luft über 8 Stunden gefilmt. Siehe für ergänzende Informationen zur Methodik, Auswertung und Darstellung Legende Abbildung 10; ein Video je Kondition; dieser Versuch wurde zwei Mal durchgeführt

5.2.2 DC-T_{reg}-Zell-Kontakte sind unter CCL17 Knockdown in DCs verringert

Aufbauend auf den Ergebnissen mit CCL17 Überexpression wurde in diesem Experiment die Hypothese durch DCs mit CCL17-Knockdown durch RNA-Interferenz ergänzend überprüft. Hierfür wurden DCs aus Knochenmark von WT Mäusen generiert, einer RNA-Interferenz durch Elektroporation unterzogen und mit T_{reg}-Zellen in einem dreidimensionalen Kontakt- und Migrationsassay kokultiviert. Der Versuchsaufbau entspricht dem unter 5.1.3, Seite 46 beschriebenem.

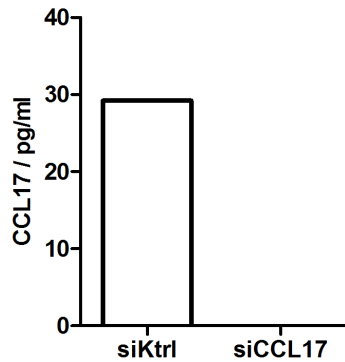


Abbildung 17: CCL17 ELISA aus Überstand von Versuch mit DCs mit CCL17-RNA-Interferenz

CCL17 Konzentration wurde aus dem Überstand der Kokultur von T_{reg} -Zellen mit DCs mit Kontroll-siRNA (links) oder mit gegen CCL17-mRNA gerichtete siRNA (rechts) bestimmt.

Durch die Transfektion zeigte sich eine Suppression der CCL17 Produktion im Vergleich zur Kontroll-siRNA (siehe Abbildung 17). Für die DCs mit eingeschränkter Fähigkeit zur CCL17-Produktion zeigte sich eine deutliche Abnahme der Kontaktrate mit T_{reg} -Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 18). Dieser Versuch bestätigt die Bedeutung von CCL17 für die DC- T_{reg} -Zell-Kontaktformation.

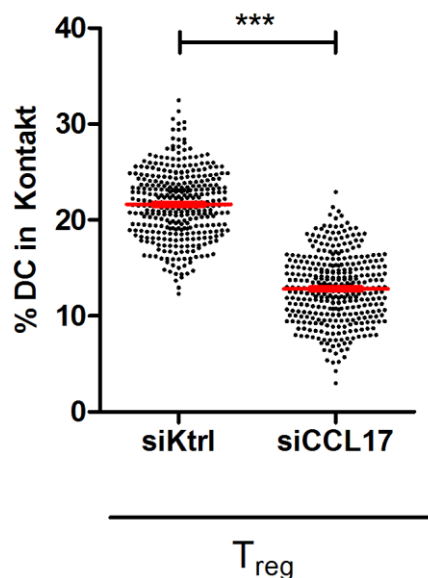


Abbildung 18: DCs mit RNA-Interferenz Knockdown von CCL17 mit T_{reg} -Zellen

10^5 mit PKH67 (grün) gefärbte BMDCs und 10^6 mit PKH26 (rot) gefärbte T_{reg} -Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO_2 -haltiger Luft über 8 Stunden gefilmt. BMDCs wurden aus Knochenmark von WT Mäusen generiert und einer RNA-Interferenz entweder mit Kontroll-siRNA (siKtrl) oder siRNA gegen CCL17-mRNA (siCCL17) unterzogen. Siehe für ergänzende Informationen zur Auswertung und Darstellung Legende Abbildung 10; ein Video je Kondition; dieser Versuch wurde zwei Mal durchgeführt

5.3 CCL22-vermittelte Kontaktformation ist CCR4-abhängig

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Attraktion von T_{reg} -Zellen zu DCs von CCL22 und CCL17 abhängig ist (siehe 5.1 und 5.2). Wie anfangs erwähnt ist CCR4 der einzige bekannte Rezeptor dieser beiden Chemokine und wird fast ausschließlich auf T_{reg} -Zellen exprimiert (siehe 1.4.2, Seite 11). Vor diesem Hintergrund ist zu erwarten, dass die auf CCL22- und CCL17-basierende Attraktion gleichsam auch von dem Vorhandensein von CCR4 auf T_{reg} -Zellen abhängig ist. In diesem Experiment wurde diese Hypothese überprüft.

Der grundsätzliche Aufbau des Versuches entspricht dem unter 5.1.1, Seite 42, beschriebenem. Als DCs wurden hier nun DC2.4 mit CCL22 Überexpression und als T-Zellen T_{reg} -Zellen aus CCR4-Knockout und WT Mäusen verwendet.

Während in der Gruppe mit WT T_{reg} -Zellen die Kontaktformation unter CCL22 Überexpression zunahm, war in der Gruppe mit CCR4-Knockout T_{reg} -Zellen keine Zunahme zu beobachten (Abbildung 19). Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass die Attraktion von T_{reg} -Zellen zu DCs über die CCL22-CCR4-Achse vermittelt wird.

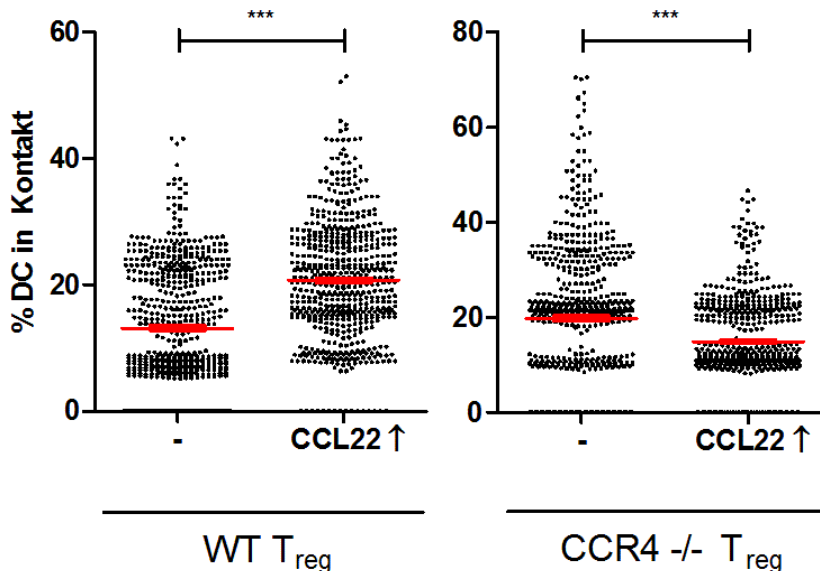


Abbildung 19: CCL22 überexprimierende DC2.4 mit WT T_{reg} - und CCR4-Knockout T_{reg} -Zellen

10^5 mit PKH67 (grün) gefärbte, mit CCL22-Tet-On Konstrukt stabil transduzierte DC2.4 und 10^6 mit PKH26 (rot) gefärbte WT T_{reg} , bzw. CCR4 $-/-$ T_{reg} -Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO_2 -haltiger Luft über 8 Stunden gefilmt. Siehe für ergänzende Informationen zur Methodik, Auswertung und Darstellung Legende Abbildung 10. Drei Videos je Kondition; Fehlerbalken = SEM; p *** < 0,001

5.4 *In vivo* induzieren CCL22-defiziente dendritische Zellen eine verstärkte Immunantwort

Nachdem *in vitro* die spezifische Attraktion von T_{reg}-Zellen zu DCs durch CCL22 (siehe 5.1, Seite 42) und dessen Abhängigkeit von der CCR4 Expression (siehe 5.3, Seite 51) gezeigt werden konnte, wurde die Rolle der CCL22-vermittelten T_{reg}-DC-Kontaktformation *in vivo* untersucht.

Vor dem Hintergrund der immunsuppressiven Wirkung der T_{reg}-Zellen ist zu erwarten, dass DCs, welche kein CCL22 produzieren und damit weniger Kontakte mit T_{reg}-Zellen haben, eine stärkere Immunreaktion hervorrufen. Diese Hypothese wurde im Rahmen eines Vakzinierungsversuches mit aktivierten und mit Antigen-beladenen DCs untersucht. Hierzu wurde die Immunantwort, die von CCL22-defizienten DCs hervorgerufen wird mit der von WT DCs verglichen.

Hierfür wurden C57 BL/6 Mäuse mit WT oder CCL22 ^{-/-} DCs vakziniert und die Stärke der Immunantwort quantifiziert. Konkret wurden WT Mäusen dreimalig im Abstand von 14 Tagen intraperitoneal OVA₂₅₇₋₂₆₄ gepulste BMDCs, CpG und Imject Alum injiziert. Die BMDCs wurden entweder aus Knochenmark von WT Mäusen oder von CCL22 ^{-/-} Mäusen generiert. Sieben Mäuse wurden mit CCL22 ^{-/-} DCs vakziniert, sieben weitere mit WT DCs und vier wurden nicht vakziniert. Als Maß für die Immunantwort wurden eine Woche nach der letzten Injektion ein IFN- γ Restimulationsassay sowie eine Bestimmung des Anteils OVA₂₅₇₋₂₆₄ spezifischer zytotoxischer T-Zellen mit aus peripherem Blut gewonnenen Zellen vorgenommen.

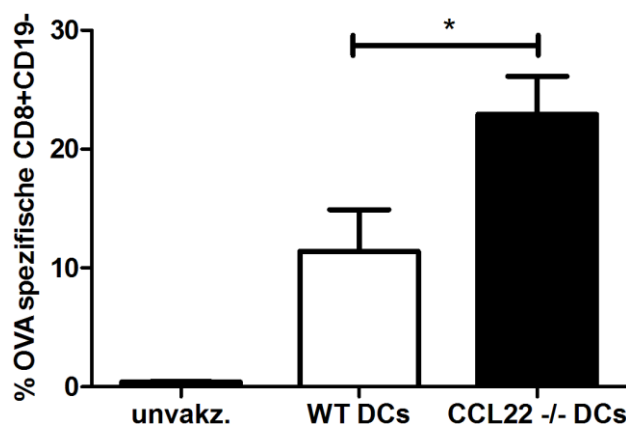


Abbildung 20: Bestimmung OVA₂₅₇₋₂₆₄ spezifischer CD8+ CD19- Zellen aus peripherem Blut

2 Millionen, aus peripherem Blut isolierte Zellen wurden mit H-2Kb OVA₂₅₇₋₂₆₄ PE Pentameren, pacific blue anti-CD8 Antikörper und anti-CD19 PerCP-Cy5.5 Antikörper gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt

sind die % OVA spezifischen CD8+ CD19- Zellen, jeweils für die Gruppen unvakziniert (4 Mäuse), vakziniert mit WT DCs (7 Mäuse) und vakziniert mit CCL22 -/- DCs (7 Mäuse). Fehlerbalken = SEM; $p < 0,05$; dieser Versuch wurde zwei Mal durchgeführt

Mit CCL22 -/- DCs vakzinierte Mäuse hatten etwa doppelt so viele OVA spezifische T-Zellen und etwa dreimal so viele IFN- γ positive CD8+ Zellen nach OVA-Restimulation wie Mäuse, die mit WT DCs vakziniert wurden (Abbildung 20 und Abbildung 21). Diese Ergebnisse deuten auf eine hohe Relevanz von CCL22 für die Funktion von DCs *in vivo* hin.

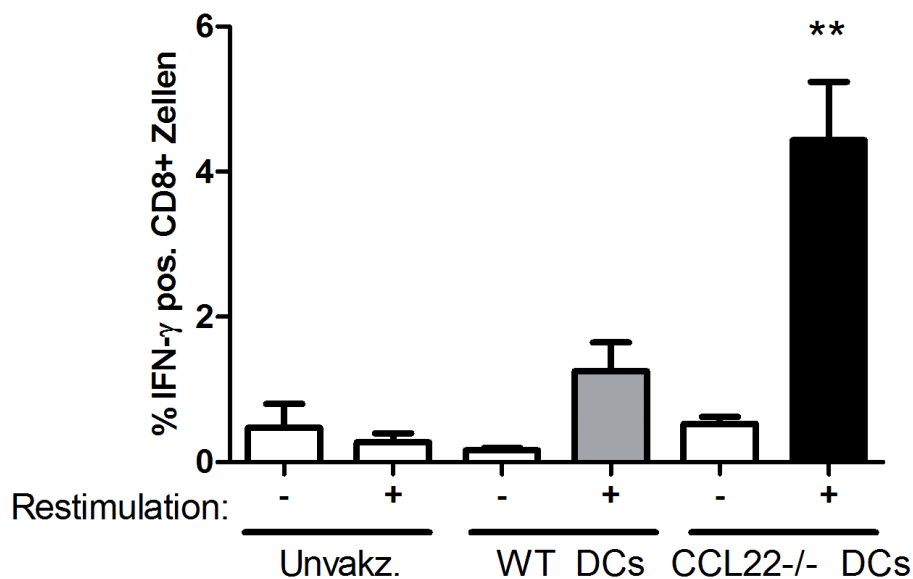


Abbildung 21: Bestimmung IFN- γ positiver CD8+ Zellen nach OVA₂₅₇₋₂₆₄ Restimulation

4 Millionen aus peripherem Blut isolierte Zellen wurden mit 5 μ g/ml OVA₂₅₇₋₂₆₄ restimuliert und Brefeldin A ausgesetzt. Nach 4 Stunden wurde die Zelloberfläche mit anti-CD8 APC-Cy-7 Antikörper und das Zellinnere mit anti-IFN- γ *pacific blue* Antikörper gefärbt und die Auswertung mittels FACS vorgenommen. Dargestellt sind die % IFN- γ + CD8+ Zellen, jeweils ohne und mit Restimulation für die Gruppen unvakziniert (4 Mäuse), vakziniert mit WT DCs (7 Mäuse) und vakziniert mit CCL22 -/- DCs (7 Mäuse). Fehlerbalken = SEM; $p < 0,01$; dieser Versuch wurde zwei Mal durchgeführt

5.5 CCL22 und CCL17 Produktion dendritischer Zellen führt auch im humanen System selektiv zu mehr Kontakten mit regulatorischen T-Zellen

Nachdem in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass im murinen System:

- 1) CCL22 und CCL17 selektiv T_{reg}-Zellen zu DCs anlocken (siehe 5.1 und 5.2),
- 2) dies für CCL22 in Abhängigkeit von der CCR4-Expression auf T_{reg}-Zellen geschieht (siehe 5.3) und

- 3) CCL22 defiziente DCs *in vivo* eine wesentlich stärkere Immunantwort hervorrufen als WT DCs (siehe 5.4),

sollte nun die Rolle dieser beiden Chemokine im humanen System untersucht werden.

5.5.1 DC- T_{reg} -Zell-Kontakte sind unter CCL22 Knockdown in DCs verringert

Zunächst wurden humane dendritische Zellen aus peripheren Blutmonozyten generiert und einem CCL22 Knockdown durch RNA-Interferenz unterzogen. Sie wurden mit humanen T_{reg} - und T_{eff} -Zellen in einem dreidimensionalen Kontakt- und Migrationsassay kokultiviert.

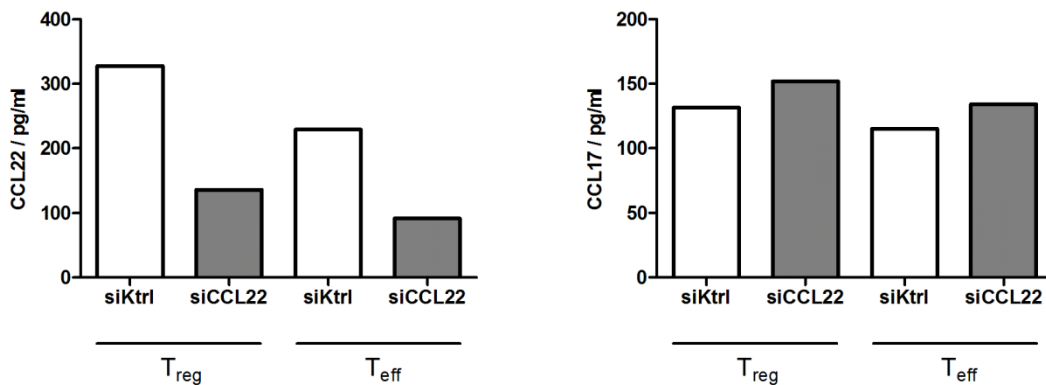


Abbildung 22: CCL22 und CCL17 ELISA aus Überstand von Versuch mit DCs mit CCL22-RNA-Interferenz (human)

Die CCL22 (links) und CCL17 (rechts) Konzentration wurde aus dem Überstand der Kokultur mit T_{reg} - (jeweils links) und T_{eff} -Zellen (jeweils rechts) jeweils mit DCs mit Kontroll-siRNA (siKtrl) oder mit gegen CCL22-mRNA gerichteter siRNA (siCCL22) bestimmt.

Die T_{reg} -Zellen wurden aus PBMCs durch MACS mit den Kriterien CD4+, CD25+ und CD127- und die T_{eff} -Zellen mit den Kriterien CD4+, CD25- und CD127+ gewonnen. Die RNA-Interferenz wurde entweder mit einer gegen CCL22-mRNA gerichteten siRNA oder einer Kontroll-siRNA durchgeführt. Ein dreidimensionaler Kontakt- und Migrationsassay wurde, wie oben, im murinen System beschrieben (siehe 5.1), durchgeführt.

Die CCL22 Konzentrationen waren in den Konditionen mit DCs mit anti-CCL22-siRNA im Vergleich zur Kondition mit Kontroll-siRNA erniedrigt, während die CCL17 Konzentration unbeeinflusst bleibt (Abbildung 22).

Für die DCs mit eingeschränkter Fähigkeit zur CCL22 Produktion zeigte sich eine deutliche Abnahme der Kontaktrate mit T_{reg} -Zellen, während mit T_{eff} -Zellen kein Unterschied zur WT Kondition festzustellen war (Abbildung 23).

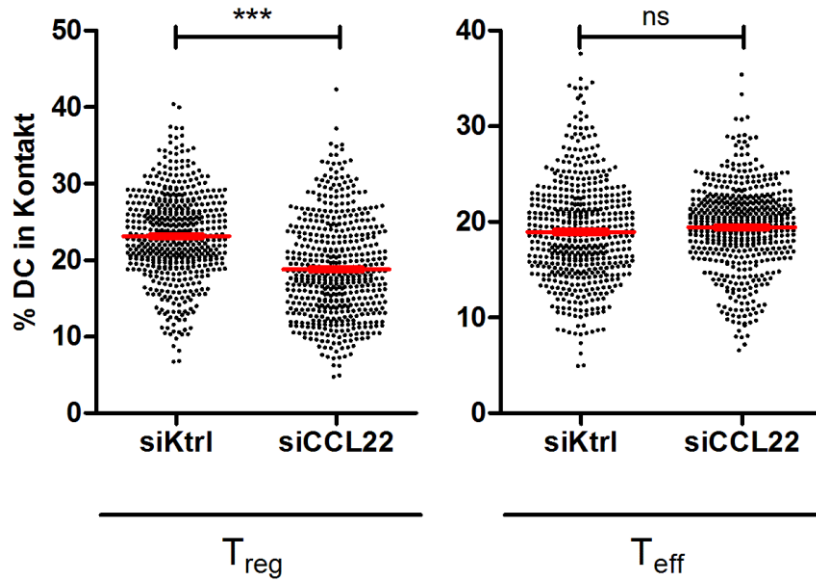


Abbildung 23: DCs mit RNA-Interferenz Knockdown von CCL22 mit T_{reg} - und T_{eff} -Zellen (human)

10^5 mit PKH67 (grün) gefärbte hBMDCs und 10^6 mit PKH26 (rot) gefärbte humane T_{reg} -, bzw. T_{eff} -Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO_2 -haltiger Luft über 8 Stunden gefilmt. hBMDCs wurden aus peripheren Blutmonozyten generiert und einer RNA-Interferenz entweder mit Kontroll-siRNA (siKtrl) oder siRNA gegen CCL22-mRNA (siCCL22) unterzogen. Siehe für ergänzende Informationen zur Auswertung und Darstellung Legende Abbildung 10; drei Videos je Kondition; dieser Versuch wurde vier Mal durchgeführt (einmal im direkten Vergleich mit T_{eff} -Zellen)

5.5.2 DC- T_{reg} -Zell-Kontakte sind unter CCL17 Knockdown in DCs verringert

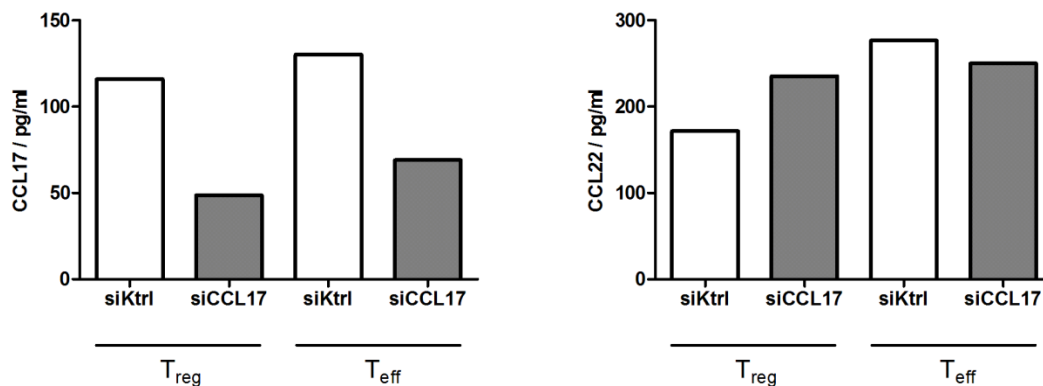


Abbildung 24 CCL17 und CCL22 ELISA aus Überstand von Versuch mit DCs mit CCL17-RNA-Interferenz (human)

Die CCL17 (links) und CCL22 (rechts) Konzentration wurde aus dem Überstand der Kokultur mit T_{reg} - (jeweils links) und T_{eff} -Zellen (jeweils rechts) jeweils mit DCs mit Kontroll-siRNA (siKtrl) oder mit gegen CCL17-mRNA gerichteter siRNA (siCCL17) bestimmt.

Analog zu dem Experiment mit CCL22 (siehe 5.5.1), wurden humane dendritische Zellen einem CCL17 Knockdown durch RNA-Interferenz unterzogen und die Kontakte mit humanen T_{reg} - und T_{eff} -Zellen quantifiziert.

Die CCL17 Konzentrationen waren in den Konditionen mit DCs mit anti-CCL17-siRNA im Vergleich zur Kondition mit Kontroll-siRNA erniedrigt, während die CCL22 Konzentration nicht abnahm (Abbildung 24).

Für die DCs nach CCL17 siRNA Behandlung zeigte sich ebenfalls eine deutliche Abnahme der Kontaktrate mit T_{reg} -Zellen, die für T_{eff} -Zellen nicht beobachtet werden konnte. Für T_{eff} -Zellen zeigte sich keine Abnahme der Kontaktformation mit DCs (Abbildung 25). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass auch im humanen System CCL17 die Kontaktformation von T_{reg} -Zellen mit DCs vermittelt.

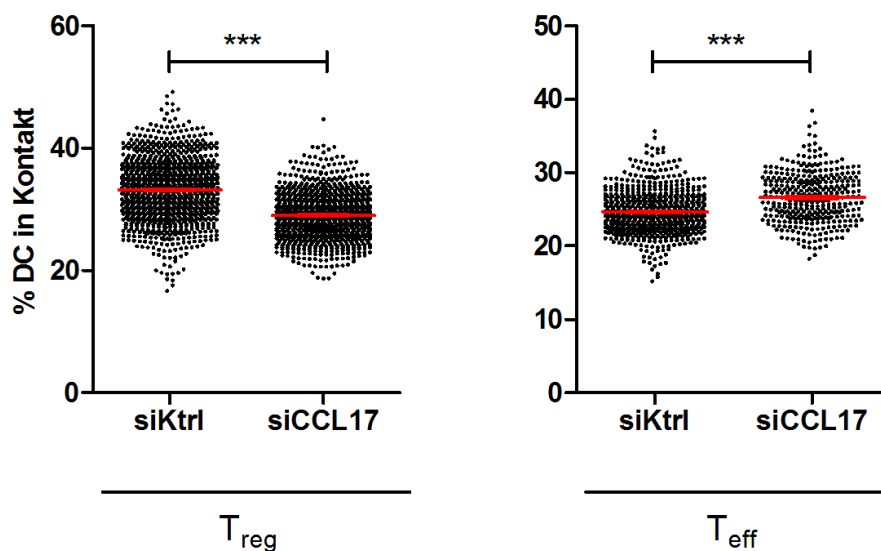


Abbildung 25: DCs mit RNA-Interferenz Knockdown von CCL17 mit T_{reg} - und T_{eff} -Zellen (human)

10^5 mit PKH67 (grün) gefärbte hBMDCs und 10^6 mit PKH26 (rot) gefärbte humane T_{reg} -, bzw. T_{eff} -Zellen wurden in ein dreidimensionales Kollagengel eingebettet und bei 37° C und Begasung mit 5% CO_2 -haltiger Luft über 8 Stunden gefilmt. hBMDCs wurden aus peripheren Blutmonozyten generiert und einer RNA-Interferenz entweder mit Kontroll-siRNA (siKtrl) oder siRNA gegen CCL17-mRNA (siCCL17) unterzogen. Siehe für ergänzende Informationen zur Auswertung und Darstellung Legende Abbildung 10; drei Videos je Kondition in T_{reg} Konditionen, zwei Videos in T_{eff} siKtrl und ein Video in T_{eff} siCCL17 Kondition;

6 Diskussion

6.1 Kontaktformation regulatorischer T-Zellen mit dendritischen Zellen wird über CCL22 und CCL17 vermittelt

T_{reg} -Zellen wirken über unterschiedliche Mechanismen suppressiv. Angefangen bei der Störung des Metabolismus anderer Zellen durch IL-2 Deprivation, über Induktion von Apoptose, Sekretion verschiedener suppressiver Zytokine und mehrerer direkt gegen DCs gerichteter Suppressionsmechanismen. Es ist bekannt, dass das Zustandekommen des Kontaktes von T_{reg} -Zellen mit DCs eine wichtige Grundvoraussetzung für die Funktion der T_{reg} -Zellen *in vitro* wie *in vivo* ist: nur durch direkten T_{reg} -DC-Kontakt wird eine Reduktion der Costimulatorischen Moleküle auf DCs erreicht (Misra et al. 2004, Onishi et al. 2008, Wing et al. 2008), die suppressiv wirkende Indolamin-2,3-Dioxygenase auf DCs induziert (Onodera et al. 2009), die Aktivierung von T-Effektorzellen verhindert (Tang et al. 2006) und T_H -Zellen davon abgehalten mit DCs zu interagieren (Tadokoro et al. 2006, Onishi et al. 2008). Mehrere führende Autoren auf dem Gebiet der T_{reg} -Zell-Forschung gehen darüber hinaus davon aus, dass es einen zentralen T_{reg} -Zell Suppressionsmechanismus gibt und dieser abhängig von dem Kontakt mit DCs ist (Sakaguchi et al. 2009, Sakaguchi et al. 2010, Wing and Sakaguchi 2010, Campbell and Koch 2011). Als aussichtsreichster Kandidat für diesen Mechanismus gilt CTLA-4. Es wird konstitutiv stark auf T_{reg} -Zellen exprimiert, ist in seiner Expression durch FoxP3 gesteuert und bei selektivem Defekt von CTLA-4 in T_{reg} -Zellen entwickelt sich schwerste Autoimmunität mit einem ähnlichen Krankheitsbild wie bei völligem Fehlen von T_{reg} -Zellen (Wing and Sakaguchi 2010).

Diese DC-spezifischen Mechanismen setzen alle den direkten Zell-Zell-Kontakt der T_{reg} -Zelle mit der DC voraus. Bislang sind die Mechanismen der Kontaktformation von DCs mit T_{reg} -Zellen nur unvollständig verstanden.

Es wurden zwei Proteine identifiziert, die überhaupt erst die Voraussetzung für einen suffizienten T_{reg} -DC-Kontakt bilden: Onishi et al. konnten zeigen, dass das Leukozyten Funktion-assoziierte Antigen-1 (LFA-1) nötig ist, um in Gegenwart von T_{eff} -Zellen effizient Kontakte mit DCs einzugehen (Onishi et al. 2008). Hierzu wurden jeweils verschieden gefärbte T_{reg} - und T_{eff} -Zellen mit DCs in einem Rundboden-Well für 12 Stunden kultiviert und danach mittels konfokaler Lasermikroskopie auf Kontaktformation mit DCs hin ausgewertet. Bei Verwendung von LFA-1 $-/-$ T_{reg} -Zellen kam es zu einer wesentlich geringeren Kontaktformation mit DCs. LFA-1 bindet an das unter anderem auf DCs

exprimierte Interzelluläre-Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1) wodurch diese die Migration von T-Zellen regulieren können (Katakai et al. 2013). Das zweite Protein, welches eine wichtige Rolle für die T_{reg}-DC-Kontaktformation darstellt, ist das stark auf T_{reg}-Zellen exprimierte Neuropilin-1 (Nrp-1) (Mizui and Kikutani 2008, Sarris et al. 2008). Nach Blockade von Nrp-1 durch Antikörper kommt es zu einer Reduktion von langanhaltenden Kontakten mit DCs. Es ist entsprechend für eine effiziente Antigenerkennung nötig und verschafft T_{reg}-Zellen durch die länger anhaltenden Kontakte einen Vorteil gegenüber T_{eff}-Zellen. Nrp-1 ist Teil der immunologischen Synapse.

Dies sind allerdings beides zell-ständige Moleküle, die auf T_{reg}-Zellen exprimiert werden. Der Anforderung einer Kontaktvermittlung auch über größere Distanz, wie sie in einem Lymphknoten von Nöten ist, werden sie nicht gerecht. Entsprechend muss es noch einen Mechanismus der T_{reg}-Zell Attraktion über lösliche Botenstoffe geben. Bei Betrachtung des Expressionsprofils von Antigen-präsentierenden Zellen für Chemokine fällt auf, dass CCL22 und CCL17 hauptsächlich von dendritischen Zellen produziert werden (Godiska et al. 1997, Imai et al. 1999, Lieberam and Forster 1999, Vulcano et al. 2001) und DCs nach Maturierung diese besonders stark exprimieren (Lieberam and Forster 1999, Vulcano et al. 2001). Gleichzeitig ist deren einziger Rezeptor, CCR4, nahezu selektiv auf T_{reg}-Zellen vorhanden und diese sprechen in ihrer Migration neben CCL1 besonders stark auf CCL22 und CCL17 an (Iellem et al. 2001).

Bisherige Untersuchungen zur Rolle von CCL22 und CCL17 bei der Anlockung von T_{reg}-Zellen zu DCs haben gezeigt, dass der Überstand von DCs, die einen Knockdown von CCL22 und CCL17 mittels RNA-Interferenz erfahren haben, eine geringere chemotaktische Wirkung auf T_{reg}-Zellen ausübt (Kang et al. 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach GM-CSF Behandlung nur CCL22 produzierende CD11c⁺ CD8⁻ DCs zu vermehrter Akkumulation von T_{reg}-Zellen in Lymphknoten führen (Layseca-Espinosa et al. 2013) und, dass in CCR4^{-/-} Mäusen DCs in mesenterischen Lymphknoten weniger IDO-Expression aufweisen, welches von T_{reg}-Zellen nur Kontakt-abhängig induziert werden kann (Onodera et al. 2009). Darüber hinaus führte die Lokalisation sowohl von CCL17 produzierenden pDCs als auch von T_{reg}-Zellen in der direkten Umgebung der hochendothelialen Venolen in einem Transplantationsmodell zu der Vermutung, dass CCL17 zur Attraktion der T_{reg}-Zellen zu den pDCs geführt haben muss (Ochando et al. 2006). Zusammenfassend ist aus diesen Beobachtungen zu schließen, dass CCL22 und CCL17 für die Kontaktformation von T_{reg}-Zellen und DCs von entscheidender Bedeutung sein könnten.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigte sich nun im CCL22-Überexpressions-Model mit einer mittels lentiviralem CCL22-Tet-On Konstrukt transfizierten DC2.4 Zelllinie eine Zunahme der Kontaktbildung mit T_{reg}-Zellen unter CCL22 Überexpression. Diese Befunde konnten im Versuch mit DCs mit CCL22-Knockout bestätigt werden: hier war eine Abnahme der Interaktionsfrequenz bei fehlendem CCL22 festzustellen. Auch im Experiment mit DCs mit RNA-Interferenz Knockdown von CCL22 wurde eine reduzierte Kontaktformation beobachtet. Für CCL17 wurde an Hand eines CCL17-Überexpressions-Models mit einer DC2.4 Zelllinie mit CCL17-Tet-On Konstrukt eine erhöhte Kontaktbildung mit T_{reg}-Zellen unter Überexpression nachgewiesen. Entsprechend wurde im Versuch mit DCs mit RNA-Interferenz Knockdown von CCL17 eine verminderte Interaktionsfrequenz festgestellt. Zusammenfassend konnten durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit CCL22 und CCL17 als direkte Vermittler der T_{reg}-Zell Attraktion hin zu DCs und der Kontaktformation mit diesen identifiziert werden.

Das hier verwendete experimentelle Setting zeichnet sich dadurch aus, dass es das erste Mal eine Untersuchung der Migration und Interaktion *in vitro* in einer deutlich physiologischeren, dreidimensionalen Matrix erlaubt. Dies ahmt die Bedingungen im Lymphknoten wesentlich besser nach, als die sonst durchgeführten zweidimensionalen Transwell-Assays zur Migrationsuntersuchung oder Versuche im Rundboden-Well zur Kolokalisation von DCs mit T_{reg}-Zellen (Onishi et al. 2008). Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode hat den Nachteil, dass durch das Absinken von Zellen während des Polymerisierungsprozesses des Gels in den obersten Kollagen-Schichten keine und in den untersten vermehrt Zellen vorhanden sind. Bei Wahl des zu untersuchenden Ausschnittes im mittleren Bereich der Matrix stellt dies jedoch keine Beeinträchtigung dar. Ein weiterer Nachteil ist der große zeitliche Aufwand der Versuche. Je nach Vorbehandlung der Zellen (beispielsweise Elektroporation zur RNA-Interferenz) benötigt ein Versuch eine Vorbereitung von 12 oder mehr Stunden. Vor Durchführung der ersten Experimente zu CCL22 und CCL17 wurden Versuche ohne Chemokin-Beeinflussung durchgeführt, in der die Reliabilität der Methode überprüft wurde. Zusammenfassend ist die Methode des dreidimensionalen Kontakt- und Migrationsassays zwar eine aufwendige, aber sehr physiologische Methode *in vitro* die Migration und Kontaktformation zu untersuchen.

6.2 Kontaktformation regulatorischer T-Zellen mit dendritischen Zellen über CCL22 und CCL17 ist selektiv für regulatorische T-Zellen

Der Rezeptor der beiden Chemokine CCL22 und CCL17, CCR4, ist nicht ausschließlich auf T_{reg}-Zellen exprimiert. Er kommt auch auf aktivierten T_h-2-Zellen vor und kann dort zur Anlockung zu Antigen präsentierenden Zellen über CCL22 und CCL17 führen (D'Ambrosio et al. 1998, Imai et al. 1999). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Zell-Kontakt von aktivierten T_h-Zellen mit DCs durch Antikörper gegen CCL22 unterbunden werden kann (Wu et al. 2001). Diese Anlockung von CCR4+ T_h-Zellen zu DCs spielt in entzündeter Haut und den dazugehörigen drainierenden Lymphknoten eine Rolle (Katou et al. 2001). Neben den T_h-2-Zellen gibt es allerdings auch in der T_h-1-Zell-Population CCR4+ Zellen (Andrew et al. 2001). Des Weiteren ist CCR4 in Gedächtnis-T-Zellen exprimiert (Campbell et al. 1999) und erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass CCR4 die Interaktion von Thymozyten und Thymus-DCs vermittelt (Hu et al. 2015). Unter *homöostatischen* Bedingungen ist CCR4 auf den in der Peripherie vorkommenden Zellen jedoch am stärksten auf T_{reg}-Zellen exprimiert und dessen Liganden erzeugen bei T_{reg}-Zellen den stärksten chemotaktischen Index (Iellem et al. 2001).

Die Experimente der vorliegenden Arbeit konnten nun zeigen, dass die Anlockung von T_{reg}-Zellen zu DCs über CCR4 und dessen Liganden CCL22 und CCL17 selektiv für T_{reg}-Zellen im Vergleich mit anderen T_h-Zellen ist. Dies wurde im Versuch mit CCL22 überexprimierenden, CCL22-defizienten und CCL17 überexprimierenden DCs bestätigt. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der Kontaktformation von DCs mit T_{reg}-Zellen im CCL22 Überexpressionsmodell von dem Vorhandensein von CCR4 auf T_{reg}-Zellen nachgewiesen. Bei Verwendung von CCR4 -/- T_{reg}-Zellen zeigte sich keine Steigerung der Interaktionsrate mit DCs.

In einigen Berichten wurde mittels konventionellem Tranwellassay gezeigt, dass auch CD4+ T_{eff}-Zellen eine minimale Migration zu CCL22 zeigen (Iellem et al. 2001, Kang et al. 2010). Im dreidimensionalen Kontakt- und Migrationsassay konnte allerdings keine vermehrte Kontaktformation festgestellt werden. Bei diesem beobachteten Widerspruch könnte die Selektion der T_{reg}-Zellen über CD25 eine Rolle spielen, da dadurch auch aktivierte CD25⁺ T_h-Zellen, welche ebenfalls CCR4 exprimieren können (siehe 1.4.2, Seite 11), der T_{reg}-Zell-Population zugeordnet werden müssten. Allerdings wurden für die Organentnahmen stets völlig unstimulierte also in Immunhomöostase befindliche Mäuse verwendet, in denen es zu keiner nennenswerten Immunaktivierung gekommen sein sollte. Des Weiteren könnte es zwar sein, dass der geringe attraktive Effekt von

CCL22 auf T_{eff}-Zellen zwar ausreicht, um in einem zweidimensionalen Transwell-Assay eine Migration zu erzeugen, nicht aber für eine suffiziente Anlockung und Zellkontaktausbildung in einem dreidimensionalen, komplexeren System.

Nach Bestätigung der selektiven Attraktion und Kontaktformation von T_{reg}-Zellen im Vergleich mit anderen T_h-Zellen ist der nächste Schritt die Untersuchung, ob es Unterschiede der Attraktion innerhalb der T_{reg}-Zell-Population gibt. Wie eingangs erwähnt, lassen sich T_{reg}-Zellen in Abhängigkeit davon, wie lange ihr Antigen-Kontakt zurück liegt in naive und Effektor T_{reg}-Zellen einteilen (siehe 1.3.1, Seite 7). Im humanen System lässt sich die Unterscheidung von naiven zu Effektor T_{reg}-Zellen anhand der Stärke der CD45RA und FoxP3 Expression vornehmen. Wie in Abbildung 26 zu sehen lassen sich drei FoxP3 positive Populationen ausmachen. Fraktion I entspricht hierbei naiven T_{reg}-Zellen und Fraktion II Effektor T_{reg}-Zellen (Miyara et al. 2009). Fraktion III hat einen T_h17-Zell ähnlichen Phänotyp. Die Expression von CCR4 ist auf Effektor-T_{reg}-Zellen stärker ausgeprägt als auf naiven T_{reg}-Zellen (Sakaguchi 2013). Die Schlussfolgerung hieraus ist, dass Effektor-T_{reg}-Zellen durch CCL22 und CCL17 entsprechend auch stärker zu DCs angelockt und eine ausgeprägtere Kontaktformation mit diesen aufweisen müssten. Dies sollte man in zukünftigen Experimenten zur Gegenüberstellung der Attraktion und Kontaktformation von naiven und Effektor T_{reg}-Zellen untersuchen.

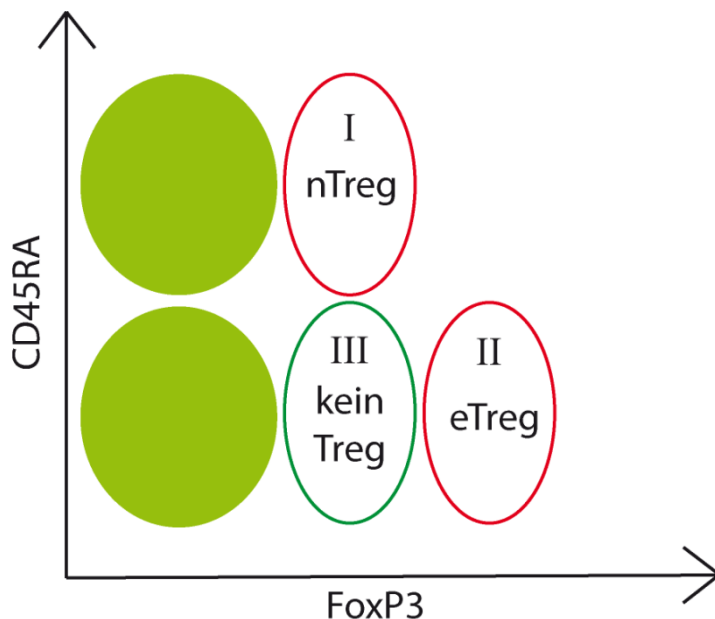


Abbildung 26: Schematische Unterscheidung verschiedener T-Zellpopulationen anhand ihrer CD45RA und FoxP3 Expression. Modifiziert nach (Miyara et al. 2009) und (Sakaguchi 2013)

Die FoxP3 positiven Populationen lassen sich in drei Fraktionen einteilen: Fraktion I = CD45RA positive und leicht FoxP3 positive Zellen, nTreg = naive T_{reg}-Zellen, Fraktion II = CD45RA negative und stark FoxP3 positive Zellen, eTreg = Effektor T_{reg}-Zellen, Fraktion III = CD45RA negative und leicht FoxP3 positive Zellen,

kein Treg = keine T_{reg}-Zellen. Die beiden FoxP3 negativen Zellpopulationen werden durch die zwei hellgrünen kreisrunden Flächen repräsentiert.

6.3 Funktionelle Bedeutung der Kontaktformation regulatorischer T-Zellen mit dendritischen Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Kontaktformation von T_{reg}-Zellen mit DCs über CCL22 und CCL17 vermittelt wird und dies selektiv für T_{reg}-Zellen im Vergleich mit anderen T_H-Zellen geschieht stellt sich die Frage, was die funktionelle Bedeutung dieser Attraktion und Kontaktformation über CCR4 und dessen Liganden ist. In bisherigen Untersuchungen wurde eine Abhängigkeit der Migration von T_{reg}-Zellen in die nicht-lymphatischen Organe Haut, Leber sowie Lunge von CCR4 festgestellt. In einer Maus mit Knochenmark, das zum Teil aus WT Zellen und zum Teil aus CCR4^{-/-} Zellen bestand wurde eine reduzierte Migration von CCR4^{-/-} T_{reg}-Zellen in eben diese Organe beobachtet (Sather et al. 2007). In der Lunge ist CCR4 für T_{reg}-Zellen darüber hinaus bei der Kontrolle der Effektor-Phase des Asthmas von Bedeutung (Afshar et al. 2013, Faustino et al. 2013). Des Weiteren spielt CCR4 auch bei der Migration hin zu Lymphknoten eine Rolle. In einem Mausmodell für entzündliche Darmerkrankungen wanderten CCR4^{-/-} T_{reg}-Zellen erst wesentlich später als WT T_{reg}-Zellen in mesenterische Lymphknoten, was maßgeblich zur Entwicklung einer autoimmunen Kolitis führte (Yuan et al. 2007). Darüber hinaus wandern mit anti-CCR4 behandelte Antigen-spezifische T_{reg}-Zellen nach Vakzinierung mit ihrem spezifischem Antigen schlechter in den drainierenden Lymphknoten (Pere et al. 2011). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CCR4 Expression auf T_{reg}-Zellen wichtig für deren Immigration in bestimmte Organe ist. Während sich CCR4^{-/-} Mäuse normal entwickeln (Chvatchko et al. 2000), kommt es bei selektiver Deletion von CCR4 in T_{reg}-Zellen zu Entwicklung einer schwersten Autoimmunerkrankung vor allem in Haut und Lunge (Sather et al. 2007). Dieser Phänotyp ähnelt dem des völligen Fehlens von T_{reg}-Zellen in der *Scurfy* Maus (Clark et al. 1999). Fraglich ist, ob der autoimmune Phänotyp *in vivo* alleine durch die reduzierte Immigration von T_{reg}-Zellen in bestimmte Organe verursacht wird. Die Rolle von CCR4 für T_{reg}-Zellen muss allerdings über die Anlockung hin zu peripheren Organen hinaus gehen, denn Bayry et al. und Davies et al. konnten zeigen, dass es zu einer gesteigerten Proliferation humaner T_{eff}-Zellen bei Nachahmung einer Immunreaktion *in vitro*, bei der die T_{eff}- und T_{reg}-Zellen durch ein Transwell zu den DCs migrieren mussten, kam, wenn CCR4-Antagonisten zugesetzt wurden (Bayry et al. 2008, Davies et al. 2009). Des Weiteren zeigten sie, dass es in der Maus zu einer gesteigerten IFN- γ Produktion *in vitro* bei Antigen-Restimulation mit CCR4-Antagonisten und einer gesteigerten

Antikörperproduktion *in vivo* nach Vakzinierung unter Zugabe von CCR4-Antagonisten kam. Dieses Experiment weist auf eine Beteiligung von CCR4 an der direkten interzellulären Funktionsweise von T_{reg}-Zellen hin. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die wichtige Funktion von CCR4 durch die Kontaktvermittlung mit DC und T_{reg}-Zellen bedingt ist. Allerdings fand bei ihnen eine Beeinflussung der CCR4-CCL22/CCL17 Achse nicht spezifisch für DCs, sondern für alle im Versuch befindlichen Zellen, sowie nicht bei der Initiierung einer Immunantwort, sondern erst bei der Restimulation statt. Des Weiteren wurde die Vakzinierung ohne DCs durchgeführt.

Um der Rolle von CCR4 für die Funktion von T_{reg}-Zellen nachzugehen wurden in der vorliegenden Arbeit Vakzinierungsversuche mit DCs, die aus Knochenmark, welches entweder von WT DCs oder CCL22^{-/-} Mäusen stammte unternommen. WT Mäuse wurden mit diesen DCs dreimalig vakziniert und im Anschluss wurde die Immunantwort an Hand peripherer Blutmonozyten quantifiziert. Mit CCL22^{-/-} DCs kam es zu einer enormen Steigerung der Immunantwort. Doppelt so viele Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen wurden generiert und nach Restimulation *in vitro* trat eine mehr als dreimal stärkere IFN- γ Produktion auf. Dies ist vergleichbar mit einer Vakzinierung nach T_{reg}-Zell-Depletion (Furuichi et al. 2005, de Goer de Herve et al. 2012). Es handelt sich hierbei um das erste Mal, dass die Rolle von CCL22 bei der Generierung einer Immunantwort spezifisch auf DCs beleuchtet wurde. Durch die beeindruckende Steigerung der Immunreaktion, die mit dem völligen Fehlen von T_{reg}-Zellen vergleichbar ist, wird ersichtlich, wie essentiell die Sekretion von CCL22 durch DCs für die Funktion von T_{reg}-Zellen sein muss.

Die eigenen Ergebnisse und die Literatur zusammenfassend, ist CCR4 auf T_{reg}-Zellen neben der schon bekannten „makroskopischen“ Migration zu peripheren und lymphatischen Organen hin auch für die „mikroskopische“, lokale Migration hin zu DCs und Kontaktformation mit diesen von grundlegender Bedeutung (siehe Abbildung 27, Seite 64). Für die Funktion von T_{reg}-Zellen ist dieser zusätzliche CCR4-vermittelte Mechanismus essentiell, denn er stellt eine Voraussetzung für den zentralen Suppressionsmechanismus der T_{reg}-Zellen dar. DCs produzieren schon im unstimulierten Grundzustand konstitutiv CCL22 und CCL17 und locken dadurch kontinuierlich T_{reg}-Zellen an. Für die Entwicklung einer Immunantwort ist immer eine Immunstimulation der Ausgangspunkt. Nach Stimulation der DC kommt es zu einer deutlichen Steigerung der CCL22 und CCL17 Produktion (Lieberman and Forster 1999, Sallusto et al. 1999). Es ist anzunehmen, dass dies einer möglichst zügigen T_{reg}-Zell Anlockung zur DC und Interaktion mit den auf ihr präsentierten Antigenen dient, um im

Fälle der Erkennung eines kommensalen oder Selbstantigens immunsuppressiv zu wirken. Bei Wegfall der CCL22 und CCL17 vermittelten Attraktion der T_{reg}-Zelle zur DC kommt es zur ungezügelter Immunreaktion mit der Entwicklung einer Immunantwort gegen harmlose oder Selbstantigene. Wie wichtig die initiale Anlockung vor allem von T_{reg}-Zellen nach Immunstimulation ist, wird auch an der Dynamik der Chemokin-Rezeptor Anpassung nach Aktivierung deutlich. Die Hochregulation eines typischen inflammatorischen Chemokin-Rezeptor-Profils inklusive CCR4 ist auf T_{reg}-Zellen im Vergleich mit anderen CD4⁺ T_h-Zellen wesentlich schneller und stärker ausgeprägt (Lee et al. 2007). Dies führt nach Antigenpräsentation möglicherweise zu einer viel früheren Attraktion von T_{reg}-Zellen zu DCs über CCR4 als der übrigen T_h-Zellen über andere hochregulierte Chemokine.

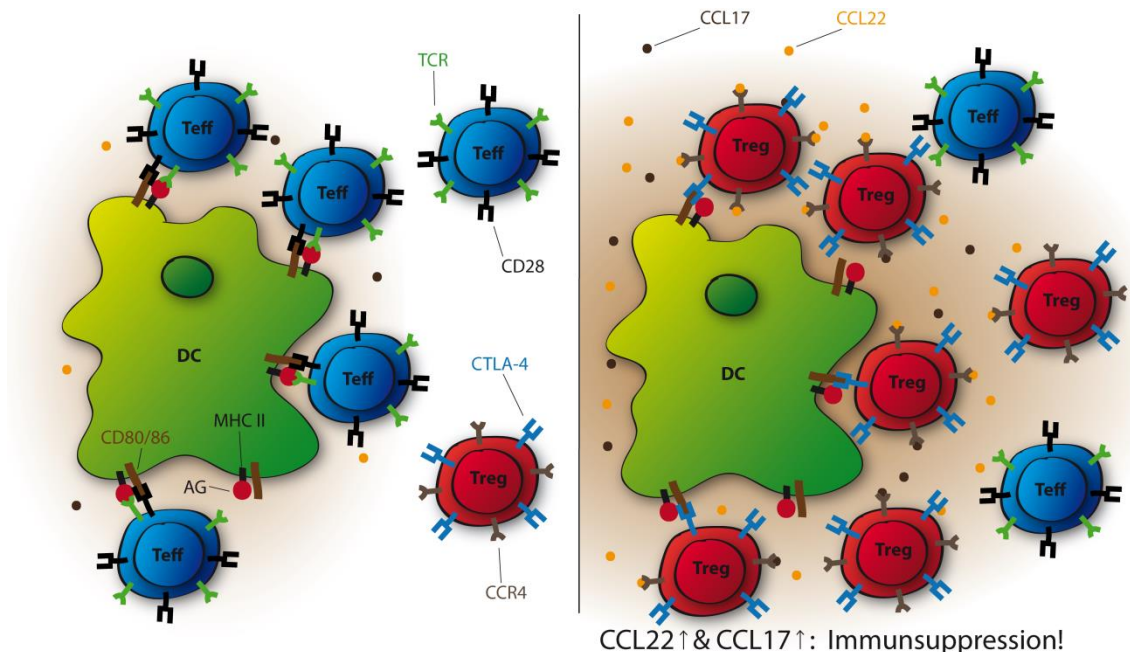


Abbildung 27: Schematische Darstellung der immunsuppressiven Wirkung von CCL22 und CCL17

Im Vergleich zum Zustand mit nur geringer CCL22 und CCL17 Produktion durch DCs (links) kommt es bei Hochregulation der beiden Chemokine (rechts) zu einer wesentlich stärkeren Kontaktformation mit T_{reg}-Zellen. Durch Interaktion von CTLA-4 auf T_{reg}-Zellen mit CD80/86 auf DCs kommt es zu dessen Transendozytose (Qureshi et al. 2011). Durch die fehlende Co-Stimulation kommt es zur Immunsuppression. TCR = T-Zell-Rezeptor, AG = Antigen;

6.4 Diskussion widersprüchlicher Literatur zu CCL17

Da CCL17 genau wie CCL22 über CCR4 wirkt und in den bisher aufgeführten Ergebnissen einen gleichsinnigen Effekt wie CCL22 hatte, liegt die Vermutung nahe, dass es auch funktionell ähnlich wie CCL22 wirkt. Man würde also einen

immunsuppressiven Effekt durch CCL17 Ausschüttung von DCs erwarten. Allerdings gibt es einige gegensätzliche Literatur zur Funktion von CCL17. So wirkt CCL17 im Mausmodell von entzündlichen Darmerkrankungen proinflammatorisch (Heiseke et al. 2012). Darüber hinaus führte die CCL17 Produktion von DCs im Mausmodell zu allergischem Asthma zu einer Verstärkung des akuten Schubes (Ait Yahia et al. 2014). Im Atherosklerosemodell wird CCL17 eine proinflammatorische Rolle durch Assoziation mit verringerter T_{reg} -Zell Akkumulation in den atherosklerotischen Läsionen zugesprochen (Weber et al. 2011). Passend hierzu wurde ein Zusammenhang der CCL17 Serumwerte mit dem Ausprägungsgrad Koronarer Herzkrankheit gefunden (Ye et al. 2015). In einem Transplantationsmodell wurde eine Abschwächung der Abstoßungsreaktion bei Fehlen von CCL17 festgestellt (Ait Yahia et al. 2014). In Nierenzellkarzinom- und Melanompatienten wies man eine Verlängerung des Überlebens bei höheren CCL17 Serumlevel nach (Cornforth et al. 2009, Walter et al. 2012). Weiterhin hat im murinen Colonkarzinommodell eine CCL17 Gentherapie zur Tumorregression geführt (Kanagawa et al. 2007). In der Zusammenschau der Literatur erscheint die Rolle von CCL17 eher immunstimulatorisch. Im Gegensatz dazu wies CCL17 in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Kontaktvermittlung zwischen DCs und T_{reg} -Zellen einen ähnlichen Effekt wie CCL22 auf. Durch CCL17 Produktion von DCs kam es zu vermehrter Kontaktformation mit T_{reg} -Zellen.

Ein möglicher Erklärungsversuch für diese widersprüchlichen Erkenntnisse ist, dass auch $CD8^+$ Gedächtniszellen eine CCR4 Expression aufweisen (Kondo and Takiguchi 2009). Tatsächlich wurde der therapeutische Effekt der Gentherapie im Colonkarzinommodell in der Studie von Kanagawa et al. auf eine verstärkte Tumorerinfiltration mit $CD8^+$ T-Zellen zurückgeführt (Kanagawa et al. 2007). CCR4 wird darüber hinaus auch auf DCs exprimiert (Sallusto et al. 1998). Die proinflammatorische Wirkung von CCL17 im Modell entzündlicher Darmerkrankungen wurde über einen autokrinen Effekt an DCs der zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine führt erklärt (Heiseke et al. 2012). Trotzdem bleibt die Frage, wieso CCL17 so unterschiedlich zu CCL22 wirken kann, obwohl beide denselben Rezeptor CCR4 besitzen. Zwar gibt es Unterschiede von CCL17 und CCL22 auf direkter Rezeptorebene, wie, dass die Bindungsaffinität von CCL22 um das Dreifache stärker ist (Imai et al. 1998), CCL22 einen stärkeren Calcium-Einstrom auslöst (Imai et al. 1998, D'Ambrosio et al. 2002) und es zumindest auf humanen T_H -2-Zellen durch CCL22 zu einer stärkeren CCR4 Internalisierung kommt (Mariani et al. 2004). Darüber hinaus spielt CCL17 bei der Extravasation eine Rolle und wird im Gegensatz zu CCL22 bei Entzündung endothelial exprimiert (Campbell et al. 1999, D'Ambrosio et al. 2002). Es scheint eine gewisse

Dominanz von CCL22 über CCL17 zu geben. Bei Kreuzdesensibilisierung dominiert CCL22 sowohl bei der Induktion des Calcium-Einstroms (Imai et al. 1998), als auch der Chemotaxis über CCL17 (Mariani et al. 2004). Nach intensiver CCL22 Exposition ist also die Fähigkeit auf CCL17 zu reagieren eingeschränkt, während es durch CCL17 zu keiner nennenswerten Verringerung der Reaktion auf CCL22 kommt. Des Weiteren führt CCL22 stärker zu endothelialer Adhäsion als CCL17 (D'Ambrosio et al. 2002). Tatsächlich könnten diese verschiedenen Effekte die widersprüchlichen Erkenntnisse zu CCL17 erklären.

Eine weitere Möglichkeit, die teils gegensätzliche Wirkung von CCL22 und CCL17 zu erklären ist, dass es einen zusätzlichen, bisher unbekannten Rezeptor für CCL22 oder CCL17 gibt. Diese Hypothese wurde schon mehrfach von anderen Autoren formuliert (Imai et al. 1998, Struyf et al. 1998, Schaniel et al. 1999). In der Zusammenschau können CCL22 und CCL17 zwar beide T_{reg} -Zellen selektiv zu DCs anlocken und mit diesen in Kontakt bringen, aber auch funktionell gegensätzliche Effekte vermitteln.

6.5 Übertragbarkeit auf den Menschen und klinisch-therapeutische Ansatzpunkte

Bei einer Vielzahl medizinischer Situationen ist das Gleichgewicht von Immunstimulation und Suppression von entscheidender Bedeutung, wie beispielsweise bei Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Organtransplantationen. Die immunsuppressiven T_{reg} -Zellen sind hierbei ein grundlegendes Element. Entsprechend ist es von großem Interesse, ob die Ergebnisse dieser Arbeit auf den Menschen zu übertragen sind.

T_{reg} -Zellen spielen bei dem Entkommen von Tumoren vor dem Immunsystem eine tragende Rolle (Shang et al. 2015). Durch eine Attraktion von T_{reg} -Zellen zu dem Tumorgewebe kommt es zu einer Suppression von einer gegen den Tumor gerichteten Immunreaktion (Facciabene et al. 2012). Mittlerweile gibt es viele Erkenntnisse aus Studien im Menschen, die die Beteiligung von CCL22 und CCL17 in diesem Prozess aufzeigen. So führen über CCL22 angelockte T_{reg} -Zellen im Ovarialkarzinom zu verstärktem Tumorwachstum und reduziertem Überleben (Curiel et al. 2004). In Mamma-Karzinom Schnitten kann CCL22 Expression nachgewiesen werden, die CCL22-Expression korreliert mit der T_{reg} -Zell-Attraktion und Tumor-assoziierte T_{reg} -Zellen befinden sich in direkter Nachbarschaft von DCs. Des Weiteren gibt es eine

Assoziation zwischen der Menge Tumor-infiltrierender T_{reg}-Zellen und schlechterem Überleben und die Metastasierung dieses Tumors in die Lunge wird unter anderem über pulmonale CCL22 Induktion, die zur T_{reg}-Zell Attraktion führt, ermöglicht (Gobert et al. 2009, Olkhanud et al. 2009, Anz et al. 2011). Da die Hauptproduzenten von CCL22 und CCL17 unter Normalbedingungen DCs sind, liegt die Vermutung nahe, dass diese auch eine Rolle bei der Tumor-assoziierten Produktion spielen. Für CCL22 konnte nachgewiesen werden, dass es in Tumoren so gut wie ausschließlich von DCs produziert wird (Wiedemann et al. 2016).

Die Ausnutzung der Tumoren von T_{reg}-Zellen bei dem Entkommen vor dem Immunsystem ermöglicht die Entwicklung darauf aufbauender Therapieansätze. So wird der T_{reg}-Zell-depletierende anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab bereits erfolgreich bei Melanompatienten eingesetzt (Weber 2007). Allerdings ist dies mit der Entwicklung schwerer Autoimmunreaktion verbunden, was die Anwendung einschränkt. Deshalb sind neue therapeutische Ansätze in diesem Bereich erforderlich. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Antikörpern gegen CCR4, CCL22 oder CCL17. Pere et al. führten im Mausmodell Vakzinierungen gegen Tumor-Antigene in Kombination mit Verabreichung antagonistischer Antikörper gegen CCR4 durch und konnten zeigen, dass so die Toleranz gegenüber Tumor-Antigenen überwunden werden kann (Pere et al. 2011). Auch gegen T-Zell-Lymphom kann durch anti-CCR4-Antikörper eine Immunantwort ausgelöst werden (Kumai et al. 2015). Eine andere Möglichkeit in die CCR4-CCL22/CCL17 Achse einzugreifen ist die Produktion der Chemokine auf DCs zu verringern. Anz et al. fanden heraus, dass durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems über TLR oder RIG-I die CCL22 Produktion über Typ I Interferone reduziert werden und dadurch die Anlockung von T_{reg}-Zellen in Tumoren verhindert werden kann (Anz et al. 2015).

Ein weiterer Therapieansatz sind Vakzinierungen mit DCs gegen Tumor-Antigene. Mittlerweile ist die erste DC-Vakzinierungs-Therapie von der *Food and Drug Administration (FDA)* zugelassen worden und es werden zahlreiche Phase-III-Studien hierzu durchgeführt (Dannull et al. 2005, Anguille et al. 2014, Mac Keon et al. 2015). DC-Vakzinierungen gegen Tumor-Antigene mit CCL22 und CCL17 defizienten DCs könnten analog zu den in diese Arbeit erbrachten *in vivo* Versuchen zu einer enormen Steigerung der Immunantwort gegen den Tumor führen und das bei lediglich lokaler Beeinflussung der T_{reg}-Zell-Funktion.

Durch Steigerung der T_{reg}-DC-Interaktion über verstärkte CCL22 oder CCL17 Produktion lassen sich Toleranz-induzierende DCs generieren, welche bei der Therapie von Autoimmunkrankheiten, Allergien und Transplantatabstoßungen therapeutische Möglichkeiten bieten (Steinman and Pope 2002, Steinman and Banchereau 2007, Belkaid and Oldenhove 2008, Pulendran et al. 2010). Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass CCL22 und CCL17 bei Transplantationen eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung einer Abstoßungsreaktion spielen (Ochando et al. 2006, Paantjens et al. 2008, Yu et al. 2011) und dass sich Toleranz über Vakzinierung hervorrufen lässt (Dhodapkar et al. 2001, Martin et al. 2003, Sato et al. 2003, Wakkach et al. 2003, Svensson et al. 2004).

7 Zusammenfassung

Die Regulation des Immunsystems ist für unsere Existenz von grundlegender Bedeutung. Bei Fehlregulation kommt es zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen und unzureichender Infektionsabwehr, beides kann in lebensgefährliche medizinische Situationen münden. Darüber hinaus nutzen Tumorzellen die körpereigenen Regulationsmechanismen aus, um die Entwicklung einer suffizienten Immunreaktion gegen sie zu verhindern. Für die Regulation des Immunsystems sind regulatorische T-Zellen als hochwirksame Vermittler von Immunsuppression von zentraler Bedeutung. Für eine effiziente Suppression durch regulatorische T-Zellen ist zwingend ein direkter Zellkontakt mit dendritischen Zellen erforderlich und bislang ist ungeklärt, wie diese Kontaktformation vermittelt wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Rolle der Chemokine CCL22 und CCL17 bei der Interaktion zwischen regulatorischen T-Zellen und dendritischen Zellen zu untersuchen, denn CCL22 und CCL17 werden hauptsächlich auf dendritischen Zellen und der Rezeptor CCR4 vorrangig auf regulatorischen T-Zellen exprimiert.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde die neue Methode des auf konfokaler Lasermikroskopie basierenden dreidimensionalen Migrations- und Kontaktassays entwickelt.

Es konnte gezeigt werden, dass im murinen System CCL22 und CCL17 die Kontaktformation regulatorischer T-Zellen mit dendritischen Zellen vermitteln. Dies geschieht spezifisch für regulatorische T-Zellen und nicht mit anderen T-Helfer-Zellen. Darüber hinaus ist die Kontaktformation abhängig von der CCR4-Expression auf regulatorischen T-Zellen. Auch im humanen System konnten diese Befunde durch *in vitro* generierte dendritische Zellen und siRNA-Knockdown jeweils beider Chemokine bestätigt werden.

Darauf aufbauend wurden Mäuse mit CCL22-defizienten dendritischen Zellen, die mit dem Impf-Antigen Ovalbumin beladen waren vakziniert. Dabei konnte gezeigt werden, dass CCL22-defiziente dendritische Zellen eine erheblich potentere Impfantwort hervorrufen als Wildtyp dendritische Zellen. Die verminderte Kontaktformation von

CCL22-defizienten dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen hat somit eine funktionelle Konsequenz *in vivo*, nämlich eine verstärkte Immunantwort.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit darauf hin, dass von dendritischen Zellen sezerniertes CCL22 und CCL17 einen grundlegenden Teil des Suppressionsmechanismus von regulatorischen T-Zellen ausmachen. Eine Modulation der CCL22-CCL17-CCR4 Achse könnte in Zukunft einen neuen Therapieansatz zur Behandlung von Tumoren, Autoimmunerkrankungen und Abstoßungsreaktionen nach Transplantation darstellen.

8 Literaturverzeichnis

Afshar, R., J. P. Strassner, E. Seung, B. Causton, J. L. Cho, R. S. Harris, D. L. Hamilos, B. D. Medoff and A. D. Luster. "Compartmentalized chemokine-dependent regulatory T-cell inhibition of allergic pulmonary inflammation." *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131(6): 1644-1652.

Ait Yahia, S., I. Azzaoui, L. Everaere, H. Vorng, C. Chenivesse, P. Marquillies, C. Duez, M. Delacre, T. Grandjean, J. Balsamelli, M. Fanton d'Andon, Y. Fan, C. Ple, C. Werts, I. G. Boneca, B. Wallaert, M. Chamaillard and A. Tsicopoulos. "CCL17 production by dendritic cells is required for NOD1-mediated exacerbation of allergic asthma." *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189(8): 899-908.

Andrew, D. P., N. Ruffing, C. H. Kim, W. Miao, H. Heath, Y. Li, K. Murphy, J. J. Campbell, E. C. Butcher and L. Wu. "C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential." *J Immunol* 2001; 166(1): 103-111.

Anguille, S., E. L. Smits, E. Lion, V. F. van Tendeloo and Z. N. Berneman. "Clinical use of dendritic cells for cancer therapy." *Lancet Oncol* 2014; 15(7): e257-267.

Anz, D., S. Eiber, C. Scholz, S. Endres, T. Kirchner, C. Bourquin and D. Mayr. "In breast cancer, a high ratio of tumour-infiltrating intraepithelial CD8+ to FoxP3+ cells is characteristic for the medullary subtype." *Histopathology* 2011; 59(5): 965-974.

Anz, D., M. Rapp, S. Eiber, V. H. Koelzer, R. Thaler, S. Haubner, M. Knott, S. Nagel, M. Golic, G. M. Wiedemann, F. Bauernfeind, C. Wurzenberger, V. Hornung Prof, C. Scholz, D. Mayr, S. Rothenfusser, S. Endres and C. Bourquin. "Suppression of intratumoral CCL22 by type I interferon inhibits migration of regulatory T cells and blocks cancer progression." *Cancer Res* 2015.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka. "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.

Bayry, J., E. Z. Tchilian, M. N. Davies, E. K. Forbes, S. J. Draper, S. V. Kaveri, A. V. Hill, M. D. Kazatchkine, P. C. Beverley, D. R. Flower and D. F. Tough. "In silico identified CCR4 antagonists target regulatory T cells and exert adjuvant activity in vaccination." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(29): 10221-10226.

Belkaid, Y. and G. Oldenhove. "Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells." *Immunity* 2008; 29(3): 362-371.

Bell, B. D., M. Kitajima, R. P. Larson, T. A. Stoklasek, K. Dang, K. Sakamoto, K. U. Wagner, D. H. Kaplan, B. Reizis, L. Hennighausen and S. F. Ziegler. "The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses." *Nat Immunol* 2013; 14(4): 364-371.

Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs. "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* 2001; 27(1): 20-21.

Biron, C. A. "More things in heaven and earth: defining innate and adaptive immunity." *Nat Immunol* 2010; 11(12): 1080-1082.

Boog, C. J., W. M. Kast, H. T. Timmers, J. Boes, L. P. de Waal and C. J. Melief. "Abolition of specific immune response defect by immunization with dendritic cells." *Nature* 1985; 318(6041): 59-62.

Bordon, Y. "T cell responses: a dendritic cell designed for two." *Nat Rev Immunol* 2013; 13(12): 844-845.

Borkowski, T. A., J. J. Letterio, A. G. Farr and M. C. Udey. "A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells." *J Exp Med* 1996; 184(6): 2417-2422.

Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke and K. Falk. "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." *Blood* 2007; 110(4): 1225-1232.

Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell. "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." *Nat Genet* 2001; 27(1): 68-73.

Campbell, D. J. and M. A. Koch. "Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells." *Nat Rev Immunol* 2011; 11(2): 119-130.

Campbell, J. J., G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D. P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu and E. C. Butcher. "The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells." *Nature* 1999; 400(6746): 776-780.

Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl. "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med* 2003; 198(12): 1875-1886.

Chvatchko, Y., A. J. Hoogewerf, A. Meyer, S. Alouani, P. Juillard, R. Buser, F. Conquet, A. E. Proudfoot, T. N. Wells and C. A. Power. "A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock." *J Exp Med* 2000; 191(10): 1755-1764.

Clark, L. B., M. W. Appleby, M. E. Brunkow, J. E. Wilkinson, S. F. Ziegler and F. Ramsdell. "Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant." *J Immunol* 1999; 162(5): 2546-2554.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali. "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." *Nature* 2007; 450(7169): 566-569.

Cornforth, A. N., G. J. Lee, A. W. Fowler, D. J. Carbonell and R. O. Dillman. "Increases in serum TARC/CCL17 levels are associated with progression-free survival in advanced melanoma patients in response to dendritic cell-based immunotherapy." *J Clin Immunol* 2009; 29(5): 657-664.

Cresswell, P. "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules." *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 259-293.

Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen and W. Zou. "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* 2004; 10(9): 942-949.

Curtsinger, J. M., C. S. Schmidt, A. Mondino, D. C. Lins, R. M. Kedl, M. K. Jenkins and M. F. Mescher. "Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells." *J Immunol* 1999; 162(6): 3256-3262.

D'Ambrosio, D., C. Albanesi, R. Lang, G. Girolomoni, F. Sinigaglia and C. Laudanna. "Quantitative differences in chemokine receptor engagement generate diversity in integrin-dependent lymphocyte adhesion." *J Immunol* 2002; 169(5): 2303-2312.

D'Ambrosio, D., A. Iellem, R. Bonecchi, D. Mazzeo, S. Sozzani, A. Mantovani and F. Sinigaglia. "Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells." *J Immunol* 1998; 161(10): 5111-5115.

Dannull, J., Z. Su, D. Rizzieri, B. K. Yang, D. Coleman, D. Yancey, A. Zhang, P. Dahm, N. Chao, E. Gilboa and J. Vieweg. "Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells." *J Clin Invest* 2005; 115(12): 3623-3633.

Davies, M. N., J. Bayry, E. Z. Tchilian, J. Vani, M. S. Shaila, E. K. Forbes, S. J. Draper, P. C. Beverley, D. F. Tough and D. R. Flower. "Toward the discovery of vaccine adjuvants: coupling in silico screening and in vitro analysis of antagonist binding to human and mouse CCR4 receptors." *PLoS One* 2009; 4(11): e8084.

de Goer de Herve, M. G., S. Jaafoura, M. Vallee and Y. Taoufik. "FoxP3(+) regulatory CD4 T cells control the generation of functional CD8 memory." *Nat Commun* 2012; 3: 986.

Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj. "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." *J Exp Med* 2001; 193(2): 233-238.

Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, M. Sapp, H. Desai, C. Fossella, J. Krasovsky, S. M. Donahoe, P. R. Dunbar, V. Cerundolo, D. F. Nixon and N. Bhardwaj. "Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells." *J Clin Invest* 1999; 104(2): 173-180.

Dzhagalov, I. L., H. J. Melichar, J. O. Ross, P. Herzmark and E. A. Robey. "Two-photon Imaging of the Immune System." *Curr Protoc Cytom* 2012; 0 12: Unit12.26.

Dzionek, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck and J. Schmitz. "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." *J Immunol* 2000; 165(11): 6037-6046.

Facciabene, A., G. T. Motz and G. Coukos. "T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis." *Cancer Res* 2012; 72(9): 2162-2171.

Faria, A. M. and H. L. Weiner. "Oral tolerance." *Immunol Rev* 2005; 206: 232-259.

Faustino, L., D. M. da Fonseca, M. C. Takenaka, L. Mirotti, E. B. Florsheim, M. G. Guereschi, J. S. Silva, A. S. Basso and M. Russo. "Regulatory T cells migrate to airways via CCR4 and attenuate the severity of airway allergic inflammation." *J Immunol* 2013; 190(6): 2614-2621.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky. "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* 2003; 4(4): 330-336.

Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf and M. Lipp. "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." *Cell* 1999; 99(1): 23-33.

Franchi, L., N. Kamada, Y. Nakamura, A. Burberry, P. Kuffa, S. Suzuki, M. H. Shaw, Y. G. Kim and G. Núñez. "NLRC4-driven interleukin-1 β production discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense." *Nat Immunol* 2012; 13(5): 449-456.

Fujii, S., K. Liu, C. Smith, A. J. Bonito and R. M. Steinman. "The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation." *J Exp Med* 2004; 199(12): 1607-1618.

Fujii, S., K. Shimizu, C. Smith, L. Bonifaz and R. M. Steinman. "Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein." *J Exp Med* 2003; 198(2): 267-279.

Fukuda, K., Y. Fujitsu, K. Seki, N. Kumagai and T. Nishida. "Differential expression of thymus- and activation-regulated chemokine (CCL17) and macrophage-derived chemokine (CCL22) by human fibroblasts from cornea, skin, and lung." *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(3): 520-526.

Furuichi, Y., H. Tokuyama, S. Ueha, M. Kurachi, F. Moriyasu and K. Kakimi. "Depletion of CD25+CD4+ T cells (Tregs) enhances the HBV-specific CD8+ T cell response primed by DNA immunization." *World J Gastroenterol* 2005; 11(24): 3772-3777.

Gallucci, S., M. Lolkema and P. Matzinger. "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." *Nat Med* 1999; 5(11): 1249-1255.

Gershon, R. K. and K. Kondo. "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." *Immunology* 1970; 18(5): 723-737.

Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig and M. Merad. "The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs." *J Exp Med* 2009; 206(13): 3115-3130.

Gobert, M., I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A. C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A. Puisieux, C. Caux, J. Y. Blay and C. Menetrier-Caux. "Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome." *Cancer Res* 2009; 69(5): 2000-2009.

Godiska, R., D. Chantry, C. J. Raport, S. Sozzani, P. Allavena, D. Leviten, A. Mantovani and P. W. Gray. "Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel

chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells." *J Exp Med* 1997; 185(9): 1595-1604.

Golub, E. S. "Suppressor T cells and their possible role in the regulation of autoreactivity." *Cell* 1981; 24(3): 595-596.

Griffith, J. W., C. L. Sokol and A. D. Luster. "Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity." *Annu Rev Immunol* 2014; 32: 659-702.

Hammad, H., H. H. Smits, C. Ratajczak, A. Nithiananthan, E. A. Wierenga, G. A. Stewart, A. Jacquet, A. B. Tonnel and J. Pestel. "Monocyte-derived dendritic cells exposed to Der p 1 allergen enhance the recruitment of Th2 cells: major involvement of the chemokines TARC/CCL17 and MDC/CCL22." *Eur Cytokine Netw* 2003; 14(4): 219-228.

Hammer, G. E. and A. Ma. "Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis." *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 743-791.

Hara, M., C. I. Kingsley, M. Niimi, S. Read, S. E. Turvey, A. R. Bushell, P. J. Morris, F. Powrie and K. J. Wood. "IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo." *J Immunol* 2001; 166(6): 3789-3796.

Hartmann, G., G. J. Weiner and A. M. Krieg. "CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(16): 9305-9310.

Heath, W. R. and F. R. Carbone. "Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces." *Nat Immunol* 2009; 10(12): 1237-1244.

Heath, W. R. and F. R. Carbone. "The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells." *Nat Immunol* 2013; 14(10): 978-985.

Heiseke, A. F., A. C. Faul, H. A. Lehr, I. Forster, R. M. Schmid, A. B. Krug and W. Reindl. "CCL17 promotes intestinal inflammation in mice and counteracts regulatory T cell-mediated protection from colitis." *Gastroenterology* 2012; 142(2): 335-345.

Hoebe, K., E. Janssen and B. Beutler. "The interface between innate and adaptive immunity." *Nat Immunol* 2004; 5(10): 971-974.

Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi. "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* 2003; 299(5609): 1057-1061.

Hornung, V., M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougères, S. Endres and G. Hartmann. "Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." *Nat Med* 2005; 11(3): 263-270.

Hsu, F. J., C. Benike, F. Fagnoni, T. M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E. G. Engleman and R. Levy. "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." *Nat Med* 1996; 2(1): 52-58.

Hu, Z., J. N. Lancaster, C. Sasiponganan and L. I. Ehrlich. "CCR4 promotes medullary entry and thymocyte-dendritic cell interactions required for central tolerance." *J Exp Med* 2015.

- llem, A., M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia and D. D'Ambrosio. "Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." *J Exp Med* 2001; 194(6): 847-853.
- Imai, T., M. Baba, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi and O. Yoshie. "The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4." *J Biol Chem* 1997; 272(23): 15036-15042.
- Imai, T., D. Chantry, C. J. Raport, C. L. Wood, M. Nishimura, R. Godiska, O. Yoshie and P. W. Gray. "Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4." *J Biol Chem* 1998; 273(3): 1764-1768.
- Imai, T., M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, P. W. Gray, K. Matsushima and O. Yoshie. "Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine." *Int Immunol* 1999; 11(1): 81-88.
- Imai, T., T. Yoshida, M. Baba, M. Nishimura, M. Kakizaki and O. Yoshie. "Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector." *J Biol Chem* 1996; 271(35): 21514-21521.
- Inaba, K. and R. M. Steinman. "Protein-specific helper T-lymphocyte formation initiated by dendritic cells." *Science* 1985; 229(4712): 475-479.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov. "Control of adaptive immunity by the innate immune system." *Nat Immunol* 2015; 16(4): 343-353.
- Janeway, C. A., Jr. "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1: 1-13.
- Josefowicz, S. Z., L. F. Lu and A. Y. Rudensky. "Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function." *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 531-564.
- Josefowicz, S. Z. and A. Rudensky. "Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance." *Immunity* 2009; 30(5): 616-625.
- Jugde, F., M. Alizadeh, C. Boissier, D. Chantry, L. Siproudhis, S. Corbinais, E. Quelvennec, F. Dyard, J. P. Campion, M. Gosselin, J. F. Bretagne, G. Semana and D. Heresbach. "Quantitation of chemokines (MDC, TARC) expression in mucosa from Crohn's disease and ulcerative colitis." *Eur Cytokine Netw* 2001; 12(3): 468-477.
- Kanagawa, N., M. Niwa, Y. Hatanaka, Y. Tani, S. Nakagawa, T. Fujita, A. Yamamoto and N. Okada. "CC-chemokine ligand 17 gene therapy induces tumor regression through augmentation of tumor-infiltrating immune cells in a murine model of preexisting CT26 colon carcinoma." *Int J Cancer* 2007; 121(9): 2013-2022.
- Kang, S., J. Xie, S. Ma, W. Liao, J. Zhang and R. Luo. "Targeted knock down of CCL22 and CCL17 by siRNA during DC differentiation and maturation affects the recruitment of T subsets." *Immunobiology* 2010; 215(2): 153-162.
- Kappler, J. W., N. Roehm and P. Marrack. "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus." *Cell* 1987; 49(2): 273-280.
- Kapsenberg, M. L. "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." *Nat Rev Immunol* 2003; 3(12): 984-993.

Katakai, T., K. Habiro and T. Kinashi. "Dendritic cells regulate high-speed interstitial T cell migration in the lymph node via LFA-1/ICAM-1." *J Immunol* 2013; 191(3): 1188-1199.

Katou, F., H. Ohtani, T. Nakayama, K. Ono, K. Matsushima, A. Saaristo, H. Nagura, O. Yoshie and K. Motegi. "Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and CCR4 are involved in the formation of T lymphocyte-dendritic cell clusters in human inflamed skin and secondary lymphoid tissue." *Am J Pathol* 2001; 158(4): 1263-1270.

Kearney, E. R., K. A. Pape, D. Y. Loh and M. K. Jenkins. "Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo." *Immunity* 1994; 1(4): 327-339.

Keir, M. E. and A. H. Sharpe. "The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity." *Immunol Rev* 2005; 204: 128-143.

Kisielow, P., H. Bluthmann, U. D. Staerz, M. Steinmetz and H. von Boehmer. "Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes." *Nature* 1988; 333(6175): 742-746.

Kobie, J. J., P. R. Shah, L. Yang, J. A. Rebhahn, D. J. Fowell and T. R. Mosmann. "T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine." *J Immunol* 2006; 177(10): 6780-6786.

Kondo, T. and M. Takiguchi. "Human memory CCR4+CD8+ T cell subset has the ability to produce multiple cytokines." *Int Immunol* 2009; 21(5): 523-532.

Kumagai, N., K. Fukuda and T. Nishida. "Synergistic effect of TNF-alpha and IL-4 on the expression of thymus- and activation-regulated chemokine in human corneal fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279(1): 1-5.

Kumai, T., T. Nagato, H. Kobayashi, Y. Komabayashi, S. Ueda, K. Kishibe, T. Ohkuri, M. Takahara, E. Celis and Y. Harabuchi. "CCL17 and CCL22/CCR4 signaling is a strong candidate for novel targeted therapy against nasal natural killer/T-cell lymphoma." *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64(6): 697-705.

Larsen, C. P., S. C. Ritchie, R. Hendrix, P. S. Linsley, K. S. Hathcock, R. J. Hodes, R. P. Lowry and T. C. Pearson. "Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells." *J Immunol* 1994; 152(11): 5208-5219.

Layseca-Espinosa, E., S. Korniotis, R. Montandon, C. Gras, M. Bouillie, R. Gonzalez-Amaro, M. Dy and F. Zavala. "CCL22-producing CD8alpha- myeloid dendritic cells mediate regulatory T cell recruitment in response to G-CSF treatment." *J Immunol* 2013; 191(5): 2266-2272.

Lee, C. C., A. M. Avalos and H. L. Ploegh. "Accessory molecules for Toll-like receptors and their function." *Nat Rev Immunol* 2012; 12(3): 168-179.

Lee, J. H., S. G. Kang and C. H. Kim. "FoxP3+ T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in secondary lymphoid tissues." *J Immunol* 2007; 178(1): 301-311.

Letterio, J. J. and A. B. Roberts. "Regulation of immune responses by TGF-beta." *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-161.

Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali and R. Clynes. "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." *J Immunol* 2008; 180(9): 5916-5926.

Lieberman, I. and I. Forster. "The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells." *Eur J Immunol* 1999; 29(9): 2684-2694.

Linsley, P. S., W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle and J. A. Ledbetter. "CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7." *J Exp Med* 1991; 174(3): 561-569.

Liston, A. and D. H. Gray. "Homeostatic control of regulatory T cell diversity." *Nat Rev Immunol* 2014; 14(3): 154-165.

Litman, G. W., J. P. Rast and S. D. Fugmann. "The origins of vertebrate adaptive immunity." *Nat Rev Immunol* 2010; 10(8): 543-553.

Mac Keon, S., M. S. Ruiz, S. Gazzaniga and R. Wainstok. "Dendritic cell-based vaccination in cancer: therapeutic implications emerging from murine models." *Front Immunol* 2015; 6: 243.

Maraskovsky, E., B. Pulendran, K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, K. Shortman, S. D. Lyman and H. J. McKenna. "Dramatic numerical increase of functionally mature dendritic cells in FLT3 ligand-treated mice." *Adv Exp Med Biol* 1997; 417: 33-40.

Mariani, M., R. Lang, E. Binda, P. Panina-Bordignon and D. D'Ambrosio. "Dominance of CCL22 over CCL17 in induction of chemokine receptor CCR4 desensitization and internalization on human Th2 cells." *Eur J Immunol* 2004; 34(1): 231-240.

Marrack, P. and J. Kappler. "Subversion of the immune system by pathogens." *Cell* 1994; 76(2): 323-332.

Martin-Fontecha, A., S. Sebastiani, U. E. Hopken, M. Uguccioni, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto. "Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming." *J Exp Med* 2003; 198(4): 615-621.

Martin, E., B. O'Sullivan, P. Low and R. Thomas. "Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10." *Immunity* 2003; 18(1): 155-167.

Maruyama, T., K. Kono, S. Izawa, Y. Mizukami, Y. Kawaguchi, K. Mimura, M. Watanabe and H. Fujii. "CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma." *Dis Esophagus* 2010; 23(5): 422-429.

Mayordomo, J. I., T. Zorina, W. J. Storkus, L. Zitvogel, C. Celluzzi, L. D. Falo, C. J. Melief, S. T. Ildstad, W. M. Kast, A. B. Deleo and et al. "Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity." *Nat Med* 1995; 1(12): 1297-1302.

Mellman, I. and R. M. Steinman. "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell* 2001; 106(3): 255-258.

Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N. A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler and M. B. Lutz. "Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity." *J Exp Med* 2002; 195(1): 15-21.

Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine and S. V. Kaveri. "Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells." *J Immunol* 2004; 172(8): 4676-4680.

Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochov and S. Sakaguchi. "Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor." *Immunity* 2009; 30(6): 899-911.

Mizui, M. and H. Kikutani. "Neuropilin-1: the glue between regulatory T cells and dendritic cells?" *Immunity* 2008; 28(3): 302-303.

Mizukami, Y., K. Kono, Y. Kawaguchi, H. Akaike, K. Kamimura, H. Sugai and H. Fujii. "CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer." *Int J Cancer* 2008; 122(10): 2286-2293.

Moser, B., M. Wolf, A. Walz and P. Loetscher. "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." *Trends Immunol* 2004; 25(2): 75-84.

Munz, C., R. M. Steinman and S. Fujii. "Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity." *J Exp Med* 2005; 202(2): 203-207.

Naik, S. H., P. Sathe, H. Y. Park, D. Metcalf, A. I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J. Y. Kwak, L. Wu and K. Shortman. "Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo." *Nat Immunol* 2007; 8(11): 1217-1226.

Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg and D. Schadendorf. "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Nat Med* 1998; 4(3): 328-332.

Nobelassembly (2011). "The gatekeepers of the immune system.", Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Ochando, J. C., C. Homma, Y. Yang, A. Hidalgo, A. Garin, F. Tacke, V. Angeli, Y. Li, P. Boros, Y. Ding, R. Jessberger, G. Trinchieri, S. A. Lira, G. J. Randolph and J. S. Bromberg. "Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts." *Nat Immunol* 2006; 7(6): 652-662.

Ohkura, N., Y. Kitagawa and S. Sakaguchi. "Development and maintenance of regulatory T cells." *Immunity* 2013; 38(3): 414-423.

Olkhanud, P. B., D. Baatar, M. Bodogai, F. Hakim, R. Gress, R. L. Anderson, J. Deng, M. Xu, S. Briest and A. Biragyn. "Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells." *Cancer Res* 2009; 69(14): 5996-6004.

Onai, N., A. Obata-Onai, M. A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay and M. G. Manz. "Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow." *Nat Immunol* 2007; 8(11): 1207-1216.

Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi and S. Sakaguchi. "Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(29): 10113-10118.

Onodera, T., M. H. Jang, Z. Guo, M. Yamasaki, T. Hirata, Z. Bai, N. M. Tsuji, D. Nagakubo, O. Yoshie, S. Sakaguchi, O. Takikawa and M. Miyasaka. "Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions." *J Immunol* 2009; 183(9): 5608-5614.

Paantjens, A. W., J. M. Kwakkel-van Erp, W. G. van Ginkel, D. A. van Kessel, J. M. van den Bosch, E. A. van de Graaf and H. G. Otten. "Serum thymus and activation regulated chemokine levels post-lung transplantation as a predictor for the bronchiolitis obliterans syndrome." *Clin Exp Immunol* 2008; 154(2): 202-208.

Pancer, Z. and M. D. Cooper. "The evolution of adaptive immunity." *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 497-518.

Pandiyani, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo. "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." *Nat Immunol* 2007; 8(12): 1353-1362.

Pang, I. K., T. Ichinohe and A. Iwasaki. "IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8(+) T cell responses to influenza A virus." *Nat Immunol* 2013; 14(3): 246-253.

Pere, H., Y. Montier, J. Bayry, F. Quintin-Colonna, N. Merillon, E. Dransart, C. Badoual, A. Gey, P. Ravel, E. Marcheteau, F. Batteux, F. Sandoval, O. Adotevi, C. Chiu, S. Garcia, C. Tanchot, Y. C. Lone, L. C. Ferreira, B. H. Nelson, D. Hanahan, W. H. Fridman, L. Johannes and E. Tartour. "A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens." *Blood* 2011; 118(18): 4853-4862.

Pierre, P., S. J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R. M. Steinman and I. Mellman. "Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells." *Nature* 1997; 388(6644): 787-792.

Pilette, C., J. N. Francis, S. J. Till and S. R. Durham. "CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge." *Eur Respir J* 2004; 23(6): 876-884.

Pixley, F. J. and E. R. Stanley. "CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action." *Trends Cell Biol* 2004; 14(11): 628-638.

Proost, P., S. Struyf, D. Schols, G. Opdenakker, S. Sozzani, P. Allavena, A. Mantovani, K. Augustyns, G. Bal, A. Haemers, A. M. Lambeir, S. Scharpe, J. Van Damme and I. De Meester. "Truncation of macrophage-derived chemokine by CD26/ dipeptidyl-peptidase IV beyond its predicted cleavage site affects chemotactic activity and CC chemokine receptor 4 interaction." *J Biol Chem* 1999; 274(7): 3988-3993.

Pulendran, B., H. Tang and S. Manicassamy. "Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses." *Nat Immunol* 2010; 11(8): 647-655.

Qureshi, O. S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E. M. Schmidt, J. Baker, L. E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T. Z. Hou, C. E. Futter, G. Anderson, L. S. Walker and D. M. Sansom. "Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4." *Science* 2011; 332(6029): 600-603.

Ramsdell, F. and S. F. Ziegler. "FOXP3 and scurfy: how it all began." *Nat Rev Immunol* 2014; 14(5): 343-349.

Randolph, G. J., V. Angeli and M. A. Swartz. "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels." *Nat Rev Immunol* 2005; 5(8): 617-628.

Read, S., V. Malmstrom and F. Powrie. "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." *J Exp Med* 2000; 192(2): 295-302.

Reis e Sousa, C. "Dendritic cells in a mature age." *Nat Rev Immunol* 2006; 6(6): 476-483.

Reizis, B., A. Bunin, H. S. Ghosh, K. L. Lewis and V. Sisirak. "Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions." *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 163-183.

Reizis, B., M. Colonna, G. Trinchieri, F. Barrat and M. Gilliet. "Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system?" *Nat Rev Immunol* 2011; 11(8): 558-565.

Riezu-Boj, J. I., E. Larrea, R. Aldabe, L. Guembe, N. Casares, E. Galeano, I. Echeverria, P. Sarobe, I. Herrero, B. Sangro, J. Prieto and J. J. Lasarte. "Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection." *J Hepatol* 2011; 54(3): 422-431.

Romagnani, S. "Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation." *Mol Immunol* 2002; 38(12-13): 881-885.

Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer and M. K. Levings. "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." *Immunol Rev* 2006; 212: 28-50.

Rot, A. and U. H. von Andrian. "Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells." *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 891-928.

Rouse, R. V., W. van Ewijk, P. P. Jones and I. L. Weissman. "Expression of MHC antigens by mouse thymic dendritic cells." *J Immunol* 1979; 122(6): 2508-2515.

Rudensky, A. Y. "Regulatory T cells and Foxp3." *Immunol Rev* 2011; 241(1): 260-268.

Sakaguchi, S. "Control of immune responses by regulatory T cells". 15th International Congress of Immunology (ICI) 2013, Mailand.

Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino and D. A. Hafler. "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." *Nat Rev Immunol* 2010; 10(7): 490-500.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda. "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* 1995; 155(3): 1151-1164.

Sakaguchi, S., T. Takahashi and Y. Nishizuka. "Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis." *J Exp Med* 1982; 156(6): 1577-1586.

Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin and T. Yamaguchi. "Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?" *Int Immunol* 2009; 21(10): 1105-1111.

Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura and M. Ono. "Regulatory T cells and immune tolerance." *Cell* 2008; 133(5): 775-787.

Sallusto, F. "The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses." *Haematologica* 1999; 84 Suppl EHA-4: 28-31.

Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia. "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* 1995; 182(2): 389-400.

Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med* 1994; 179(4): 1109-1118.

Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp and A. Lanzavecchia. "Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function." *Eur J Immunol* 1999; 29(5): 1617-1625.

Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin and A. Lanzavecchia. "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." *Eur J Immunol* 1998; 28(9): 2760-2769.

Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe and J. A. Bluestone. "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* 2000; 12(4): 431-440.

Sancho, D. and C. Reis e Sousa. "Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis." *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 491-529.

Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr and A. G. Betz. "Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition." *Immunity* 2008; 28(3): 402-413.

Sather, B. D., P. Treuting, N. Perdue, M. Miazgowiec, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky and D. J. Campbell. "Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease." *J Exp Med* 2007; 204(6): 1335-1347.

Sato, K., N. Yamashita, N. Yamashita, M. Baba and T. Matsuyama. "Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse." *Immunity* 2003; 18(3): 367-379.

Satpathy, A. T., X. Wu, J. C. Albring and K. M. Murphy. "Re(de)fining the dendritic cell lineage." *Nat Immunol* 2012; 13(12): 1145-1154.

Schaniel, C., E. Pardali, F. Sallusto, M. Speletas, C. Ruedl, T. Shimizu, T. Seidl, J. Andersson, F. Melchers, A. G. Rolink and P. Sideras. "Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells." *J Exp Med* 1998; 188(3): 451-463.

Schaniel, C., F. Sallusto, C. Ruedl, P. Sideras, F. Melchers and A. G. Rolink. "Three chemokines with potential functions in T lymphocyte-independent and -dependent B lymphocyte stimulation." *Eur J Immunol* 1999; 29(9): 2934-2947.

Schuler, G. and R. M. Steinman. "Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro." *J Exp Med* 1985; 161(3): 526-546.

Schwartz, R. H. and D. L. Mueller. *Fundamental Immunology*. 2003 Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Shang, B., Y. Liu, S. J. Jiang and Y. Liu. "Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3(+) regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis." *Sci Rep* 2015; 5: 15179.

Shen, Z., G. Reznikoff, G. Dranoff and K. L. Rock. "Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules." *J Immunol* 1997; 158(6): 2723-2730.

Sparwasser, T., E. S. Koch, R. M. Vabulas, K. Heeg, G. B. Lipford, J. W. Ellwart and H. Wagner. "Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells." *Eur J Immunol* 1998; 28(6): 2045-2054.

Sporri, R. and C. Reis e Sousa. "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function." *Nat Immunol* 2005; 6(2): 163-170.

Steinman, R. M. "Decisions about dendritic cells: past, present, and future." *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 1-22.

Steinman, R. M. and J. Banchereau. "Taking dendritic cells into medicine." *Nature* 2007; 449(7161): 419-426.

Steinman, R. M. and Z. A. Cohn. "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* 1973; 137(5): 1142-1162.

Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig. "Tolerogenic dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685-711.

Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig. "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(1): 351-358.

Steinman, R. M. and M. Pope. "Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy." *J Clin Invest* 2002; 109(12): 1519-1526.

Steinman, R. M. and M. D. Witmer. "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75(10): 5132-5136.

Struyf, S., P. Proost, S. Sozzani, A. Mantovani, A. Wuyts, E. De Clercq, D. Schols and J. Van Damme. "Enhanced anti-HIV-1 activity and altered chemotactic potency of NH₂-terminally processed macrophage-derived chemokine (MDC) imply an additional MDC receptor." *J Immunol* 1998; 161(6): 2672-2675.

Svensson, M., A. Maroof, M. Ato and P. M. Kaye. "Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells." *Immunity* 2004; 21(6): 805-816.

Tada, T. "The immune system as a supersystem." *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 1-13.

Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille and M. L. Dustin. "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo." *J Exp Med* 2006; 203(3): 505-511.

Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak and S. Sakaguchi. "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." *J Exp Med* 2000; 192(2): 303-310.

Tang, H. L. and J. G. Cyster. "Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells." *Science* 1999; 284(5415): 819-822.

Tang, Q., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel and J. A. Bluestone. "Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice." *Nat Immunol* 2006; 7(1): 83-92.

Thornton, A. M. and E. M. Shevach. "CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* 1998; 188(2): 287-296.

Trombetta, E. S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert and I. Mellman. "Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation." *Science* 2003; 299(5611): 1400-1403.

Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman and I. Mellman. "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." *Science* 2000; 288(5465): 522-527.

van den Berg, A., L. Visser and S. Poppema. "High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma." *Am J Pathol* 1999; 154(6): 1685-1691.

Van Rooijen, N. "Binding of labelled antigens and immune complexes to macrophages and dendritic cells in cryostat sections of normal mouse spleen." *Acta Morphol Neerl Scand* 1978; 16(2): 121-127.

Vestergaard, C., K. Bang, B. Gesser, H. Yoneyama, K. Matsushima and C. G. Larsen. "A Th₂ chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA⁺CCR4⁺ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin." *J Invest Dermatol* 2000; 115(4): 640-646.

Vestergaard, C., H. Yoneyama, M. Murai, K. Nakamura, K. Tamaki, Y. Terashima, T. Imai, O. Yoshie, T. Irimura, H. Mizutani and K. Matsushima. "Overproduction of Th₂-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions." *J Clin Invest* 1999; 104(8): 1097-1105.

Vignali, D. A., L. W. Collison and C. J. Workman. "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* 2008; 8(7): 523-532.

Vivier, E., D. H. Raulet, A. Moretta, M. A. Caligiuri, L. Zitvogel, L. L. Lanier, W. M. Yokoyama and S. Ugolini. "Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells." *Science* 2011; 331(6013): 44-49.

Vulcano, M., C. Albanesi, A. Stoppacciaro, R. Bagnati, G. D'Amico, S. Struyf, P. Transidico, R. Bonecchi, A. Del Prete, P. Allavena, L. P. Ruco, C. Chiabrando, G. Girolimoni, A. Mantovani and S. Sozzani. "Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo." *Eur J Immunol* 2001; 31(3): 812-822.

Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breittmayer, F. Cottrez and H. Groux. "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." *Immunity* 2003; 18(5): 605-617.

Walter, S., T. Weinschenk, A. Stenzl, R. Zdrojowy, A. Pluzanska, C. Szczylik, M. Staehler, W. Brugger, P. Y. Dietrich, R. Mendrzyk, N. Hilf, O. Schoor, J. Fritsche, A. Mahr, D. Maurer, V. Vass, C. Trautwein, P. Lewandrowski, C. Flohr, H. Pohla, J. J. Stanczak, V. Bronte, S. Mandruzzato, T. Biedermann, G. Pawelec, E. Derhovanessian, H. Yamagishi, T. Miki, F. Hongo, N. Takaha, K. Hirakawa, H. Tanaka, S. Stevanovic, J. Frisch, A. Mayer-Mokler, A. Kirner, H. G. Rammensee, C. Reinhardt and H. Singh-Jasuja. "Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival." *Nat Med* 2012; 18(8): 1254-1261.

Walunas, T. L., D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson and J. A. Bluestone. "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." *Immunity* 1994; 1(5): 405-413.

Weber, C., S. Meiler, Y. Doring, M. Koch, M. Drechsler, R. T. Megens, Z. Rowinska, K. Bidzhekov, C. Fecher, E. Ribechini, M. A. van Zandvoort, C. J. Binder, I. Jelinek, M. Hristov, L. Boon, S. Jung, T. Korn, M. B. Lutz, I. Forster, M. Zenke, T. Hieronymus, T. Junt and A. Zernecke. "CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice." *J Clin Invest* 2011; 121(7): 2898-2910.

Weber, J. "Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events." *Oncologist* 2007; 12(7): 864-872.

Wiedemann, G. M., M. M. L. Knott, V. K. Vetter, M. Rapp, S. Haubner, J. Fessler, B. Kühnemuth, P. Layritz, R. Thaler, S. Kruger, S. Ormanns, D. Mayr, S. Endres and D. Anz. "Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells." *Oncoimmunology* 2016: 00-00.

Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura and S. Sakaguchi. "CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function." *Science* 2008; 322(5899): 271-275.

Wing, K. and S. Sakaguchi. "Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity." *Nat Immunol* 2010; 11(1): 7-13.

Worbs, T., T. R. Mempel, J. Bolter, U. H. von Andrian and R. Forster. "CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo." *J Exp Med* 2007; 204(3): 489-495.

Wu, M., H. Fang and S. T. Hwang. "Cutting edge: CCR4 mediates antigen-primed T cell binding to activated dendritic cells." *J Immunol* 2001; 167(9): 4791-4795.

Wu, Q., Y. Wang, J. Wang, E. O. Hedgeman, J. L. Browning and Y. X. Fu. "The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues." *J Exp Med* 1999; 190(5): 629-638.

Ye, Y., X. Yang, X. Zhao, L. Chen, H. Xie, Y. Zeng, Z. Shen, Z. Fan, Z. Liu and S. Zhang. "Serum chemokine CCL17/thymus activation and regulated chemokine is correlated with coronary artery diseases." *Atherosclerosis* 2015; 238(2): 365-369.

Young, J. W., L. Koulova, S. A. Soergel, E. A. Clark, R. M. Steinman and B. Dupont. "The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro." *J Clin Invest* 1992; 90(1): 229-237.

Yu, K., Z. Chen, I. Khatri and R. M. Gorczynski. "CCR4 dependent migration of Foxp3+ Treg cells to skin grafts and draining lymph nodes is implicated in enhanced graft survival in CD200tg recipients." *Immunol Lett* 2011; 141(1): 116-122.

Yu, X., K. Harden, L. C. Gonzalez, M. Francesco, E. Chiang, B. Irving, I. Tom, S. Ivelja, C. J. Refino, H. Clark, D. Eaton and J. L. Grogan. "The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells." *Nat Immunol* 2009; 10(1): 48-57.

Yuan, Q., S. K. Bromley, T. K. Means, K. J. Jones, F. Hayashi, A. K. Bhan and A. D. Luster. "CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease." *J Exp Med* 2007; 204(6): 1327-1334.

9 Abkürzungsverzeichnis

BMDCs	murine <i>Bonemarrow-derived-dendritic-cells</i> (Seite 23)
CCL	<i>Chemotactic cytokine ligand</i> (Seite 11)
CCL22 -/-	CCL22 Knockout (Seite 19)
CCR	<i>Chemotactic cytokine receptor</i> (Seite 11)
CCR4 -/-	CCR4 Knockout (Seite 20)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Seite 3)
cDNA	komplementäre DNA (Seite 24)
CpG	Cytosin- und Guanin-reiche Oligonukleotid (Seite 18)
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> (Seite 9)
DC	dendritische Zellen (Seite 2)
dNTPs	2'-Desoxynukleosid 5'-Triphosphate (Seite 25)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (Seite 15)
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent assay</i> (Seite 31)
FACS	<i>Fluoreszent-activated cell sorting</i> (Seite 32)
FCS	Fetales Kälberserum (Seite 16)
FoxP3	<i>Forkhead-box-protein P3</i> (Seite 7)
hBMDCs	<i>human blood-monocyte-derived-dendritic-cells</i> (Seite 22)
IFN	Interferon (Seite 2)
IL	Interleukin (Seite 4)
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i> (Seite 23)
MHC	<i>Major-Histocompatibility-Complex</i> (Seite 3)
mRNA	<i>messenger-RNA</i> (Seite 24)
NaCl	Natriumchlorid (Seite 22)
ns	nicht signifikant (Seite 44)
OD	Optische Diche (Seite 25)
OVA	Ovalbumin (Seite 33)
PBS	<i>Phosphate-buffered-saline</i> (Seite 17)
pDC	plasmazytoide DC (Seite 2)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Seite 26)
PRR	<i>Pattern-recognition-receptor</i> (Seite 3)
RIG-I	<i>Retinoic-acid-inducible-gene I</i> (Seite 4)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Seite 21)
RT	Raumtemperatur (Seite 24)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Seite 35)
siCCL17	siRNA gegen CCL17 <i>messenger RNA</i> (Seite 50)

siCCL22	siRNA gegen CCL22 <i>messenger RNA</i> (Seite 47)
siKtrl	Kontroll-siRNA (Seite 47)
siRNA	<i>small interfering RNA</i> (Seite 18)
TLR	Toll-like-Rezeptor (Seite 4)
T _{eff} -Zelle	Effektor-T-Zelle (Seite 42)
T _h -Zelle	T-Helfer-Zelle (Seite 1)
T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle (Seite 7)
WT	Wildtyp (Seite 44)

10 Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. David Anz möchte ich für die Überlassung dieses äußerst spannenden Promotionsthemas und die sehr engagierte Betreuung über die letzten Jahre hinweg meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Ebenfalls herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Stefan Endres für die Möglichkeit meine Promotion in der Abteilung für klinische Pharmakologie anzufertigen, von deren überaus angenehmer Arbeitsatmosphäre ich sehr profitiert habe. Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Unterstützung im Rahmen des Förderprogrammes für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU danken. Auch geht mein Dank an Herrn Dr. Moritz Rapp, der mich vor allem zu Beginn meiner Laborarbeit sehr unterstützt hat. Ebenfalls bei allen weiteren Postdoktoranden und Doktoranden der Abteilung bedanke ich mich für die angenehme und stets inspirierende Zusammenarbeit.

11 Veröffentlichungen

Posterpräsentationen

Mai 2017	The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2017, Baltimore, USA: „Optical coherence tomography angiography in uveitis: a novel marker of disease activity“
Mai 2017	ARVO 2017, Baltimore, USA: „Smartphone-based optic nerve head evaluation: mydriasis makes a difference“
Okt 2016	Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) 2016, Berlin, Deutschland: „Algorithmen zur automatisierten Analyse von Biomarkern der Altersabhängigen Makuladegeneration in der optischen Kohärenztomographie: ein systematischer Review“
Sep 2016	European Society of Retina Specialists (EURETINA) 2016, Kopenhagen, Dänemark: „Algorithms for the automated analysis of age-related macular degeneration biomarkers on optical coherence tomography: A systematic review“
Mär 2015	9. World-Immune-Regulation-Meeting (WIRM), Davos, Schweiz: „CCL22 mediates contacts between dendritic cells and regulatory t-cells“
Mai 2012	DoktaMed (Doktorarbeitsmesse) 2012, München, Deutschland: „Die Rolle von Chemokinen in der Tumorummunologie im 3D in vitro Migrationsmodell“
Mai 2011	DoktaMed 2011, München, Deutschland: „Die Rolle von Chemokinen in der Tumorummunologie im 3D in vitro Migrationsmodell“

Vorträge

Nov 2016	Fortbildung für niedergelassene Augenärzte, Universitäts-Augenklinik Bonn: „AngioOCT bei Uveitis – was bringt uns das?“
Sep 2016	European Society of Retina Specialists (EURETINA) 2016, Kopenhagen, Dänemark: „Vitreous epilation“
Jun 2013	Retreat des Graduiertenkollegs 1202, Ohlstadt, Deutschland: „The role of CCL22 and CCL17 for the interaction of dendritic cells and regulatory t-cells“
Mai 2012	Symposium des „Förderprogrammes für Forschung und Lehre“ der LMU München, Herrsching, Deutschland: „Die Rolle von CCL22 und CCL17 für die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen“

Originalarbeiten

Wintergerst MW, Pfau M, Müller PL, Berger M, Holz FG, Finger RP

„Optical coherence tomography angiography in intermediate uveitis: qualitative and quantitative analysis of retinal and choriocapillary perfusion“

Manuskript in Vorbereitung, 2017

Rapp M, Wintergerst MW, Kunz W, Vetter VK, Knott MML, Lisowski D, Haubner S, Moder S, Thaler R, Eiber S, Knott M, Layritz P, Kühnemuth B, Stutte S, Bourquin C, von Andrian UH, Endres S, Anz D

„Constitutive expression of CCL22 maintains immune homeostasis by recruiting regulatory T cells to dendritic cells“

Eingereicht, 2017

Gorgi Zadeh S, Wintergerst MW, Wiens V, Thiele S, Holz FG, Finger RP, Schultz T

CNNs Enable Accurate and Fast Segmentation of Drusen In Optical Coherence Tomography

Manuskript akzeptiert für *Deep Learning in Medical Image Analysis (DLMIA) Workshop, Medical Image Computing & Computer Assisted Interventions (MICCAI) 2017*, Sep 2017, Quebec City, Quebec, Canada

Gorgi Zadeh S, Didas S, Wintergerst MW, Schultz T

Multi-Scale Anisotropic Fourth-Order Diffusion Improves Ridge and Valley Localization

Journal of Mathematical Imaging and Vision 2016:1-13

Brandl C, Stark KJ, Wintergerst MW, Heinemann M, Heid IM, Finger RP

Epidemiologie der altersbedingten Makuladegeneration

Ophthalmologie 2016, 9:735-45

Herrmann FE, Lenski M, Steffen J, Kailuweit M, Nikolaus M, Koteeswaran R, Schiller M, Sailer A, Soederstroem V, Hanszke A, Wintergerst MW, Dittmer S, Mayr D, Genzel-Boroviczeny O, Eley D, Fischer M

„A survey study on student preferences regarding pathology teaching in Germany: a call for curricular modernization“

BMC medical education 2015; 15:94

Lech M, Lorenz G, Kulkarni OP, Grosser MO, Stigrot N, Darisipudi MN, Günthner R, Wintergerst MW, Anz D, Susanti HE, Anders HJ

“NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF- β receptor signaling“

Ann Rheum Dis. 2014; 12:2224-35

Reviews

Wintergerst MW, Schultz T, Birtel J, Schuster AK, Pfeiffer N, Schmitz-Valckenberg S, Holz FG, Finger RP

Algorithms for the automated analysis of age-related macular degeneration biomarkers on optical coherence tomography: A systematic review

Translational Vision Science and Technology, 2017, im Druck

Case reports

Wintergerst MW, Herrmann P, Finger RP

„A case of Vogt-Koyanagi-Harada disease with impaired choroidal perfusion on Optical Coherence Tomography Angiography“

Eingereicht, 2017

12 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Maximilian Wilhelm Maria Wintergerst
Geburtsdatum: 12. Februar 1989 in Trostberg, Deutschland
Nationalität: Deutsch

Ausbildung und Beruf

Apr – Mai 2017 Forschungsaufenthalt am Sankara Eye Hospital, Sankara Academy of Vision, Bangalore, Indien

seit 01. Dez 2015 Assistenzarzt an der Universitäts-Augenklinik Bonn

29. Mai 2015 Approbation als Arzt
Gesamtnote der ärztlichen Prüfung: „sehr gut“ (1,00)

Okt 2010 - Mai 2015 Klinischer Studienabschnitt Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München
3. Staatsexamen: „sehr gut“
2. Staatsexamen: „sehr gut“
Wahlfach Augenheilkunde: „sehr gut“
Praktisches Jahr
Teil I: Innere Medizin (USA)
New York Presbyterian Hospital, Weill Cornell Med College & University of Cincinnati, College of Medicine
Teil II: Augenheilkunde
Augenklinik der LMU München
Teil III: Allgemeine Chirurgie
Klinik München Perlach

Okt 2008 - Aug 2010 Vorklinischer Studienabschnitt Medizin an der LMU München
1. Staatsexamen: „sehr gut“ (1,0)
Wahlfach Englisch für Mediziner: „sehr gut“

Sep 1999 - Jun 2008 Johannes-Heidenhain-Gymnasium Traunreut
Abiturnote 1,2 (Jahgangsbester)

Promotion

2011 - 2013 Abteilung für klinische Pharmakologie der LMU München
Abteilungsleitung: Prof. Dr. med. Stefan Endres
Betreuung: PD Dr. med. David Anz

Titel: „Regulation der Immunantwort: CCL22 und CCL17 vermitteln die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen“

Stipendien und Auszeichnungen

2017	Kongressreise-Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) für den Kongress der <i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i> (ARVO) 2017, Baltimore, USA
2016	Forschungsförderung Tropenophthalmologie 2016 der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) für ein Projekt zum Smartphone-basierten Diabetische Retinopathie Screening in Süd-Indien
2014	PJ-Stipendium „Studierende Exzellenz Programm“ (StEP) der LMU München (ehem. <i>Munich-Harvard-Alliance</i>)
2014	Auslandsstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)
2012 – 2013	Forschungsförderung für studentische Forschungsprojekte durch Lehre@LMU
2012	Posterpreis der DoktaMed 2012
2011 – 2012	Promotionsstipendium des „Förderprogrammes für Forschung und Lehre“ (FöFoLe) der LMU München